

СОДЕРЖАНИЕ

Том 63, номер 5, 2021

Характеристика пуповинной крови и использование ее в клинической практике <i>А. Г. Гончаров, К. А. Юрова, В. В. Шуплецова, Н. Д. Газатова, О. Б. Мелащенко, Л. С. Литвинова</i>	411
Коррекция постишемических изменений микроциркуляции в коре головного мозга крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток <i>И. Б. Соколова, О. П. Горшкова, Н. Н. Павличенко</i>	428
Иммуногистохимическое выявление ГАМК и $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК _A -рецептора в клетках субвентрикулярной зоны мозга крысы в неонатальный период <i>Л. И. Хожай</i>	435
Влияние преждевременного рождения на развитие миокарда крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза <i>В. В. Иванова, И. В. Мильто, О. Н. Серебрякова, И. В. Суходоло</i>	442
Иммунофенотипическая и морфометрическая оценка культуры макрофагов костного мозга, стимулированных аминодигидрофалазиндионом натрия <i>in vitro</i> <i>В. А. Поздина, У. В. Зведенинова, М. В. Улитко, И. Г. Данилова, М. Т. Абидов</i>	449
Морфогенез остеоидных структур при культивировании мезенхимных стромальных клеток на фибриллярном коллагене в присутствии силикоалюмофосфата <i>А. А. Гайдаш, М. И. Блинова, С. А. Александрова, Ю. А. Нащекина, В. К. Крутько, О. Н. Мусская, К. В. Скряцкая, А. В. Нащекин, Н. А. Михайлова, А. И. Кулак</i>	460
Реакция CD68 ⁺ , CD45RO ⁺ и катехоламинсодержащих клеток селезенки на развитие опухоли в толстой кишке у потомства спленэктомированных крыс-самок <i>О. М. Арлашкина, Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, М. Н. Михайлова</i>	474
Функциональная активность натриевых каналов ENaC в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека <i>А. В. Сударикова, В. И. Чубинский-Надеждин, В. Ю. Васильева, Д. В. Лысыкова, М. А. Шорохова, Е. А. Морачевская, Ю. А. Негуляев</i>	483
Стабильность кариотипа мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека <i>in vitro</i> <i>М. А. Шорохова, Т. М. Гринчук</i>	491
Использование оптически прозрачных электродов для оценки качества эритроцитов при их хранении <i>А. К. Евсеев, А. И. Колесникова, И. В. Горончаровская, Е. В. Трусова, А. И. Костин, А. К. Шабанов, М. М. Гольдин, С. С. Петриков</i>	500

ПОТЕРИ НАУКИ

Памяти Николая Николаевича Никольского (1931–2021)	509
--	-----

Contents

Vol. 63, No. 5, 2021

The use of umbilical cord blood and its components in clinical practice <i>A. G. Goncharov, K. A. Yurova, V. V. Shupletsova, N. D. Gazatova, O. B. Melashchenko, L. S. Litvinova</i>	411
Correction of post-ischemic microcirculation disturbances in the rat brain cortex by application of mesenchymal stem cells <i>I. B. Sokolova, O. P. Gorshkova, N. N. Pavlichenko</i>	428
Immunohistochemical detection of GABA and $\alpha 1$ subunits of the GABA _A receptor in cells of the subventricular zone of the rat's brain in the neonatal period <i>L. I. Khozhai</i>	435
Influence of preterm birth on the rat myocardium development in the early postnatal period of ontogenesis <i>V. V. Ivanova, I. V. Milto, O. N. Serebrjakova, I. V. Suhodolo</i>	442
Immunophenotypic and morphometric evaluation of bone marrow macrophages culture stimulated with sodium aminodihydrophthalazinedione <i>in vitro</i> <i>V. A. Pozdina, U. V. Zvedeninova, M. V. Ulitko, I. G. Danilova, and M. T. Abidov</i>	449
Morphogenesis of osteoid structures during cultivation of mesenchymal stromal cells on fibrillary collagen in the presence of silicoalumophosphate <i>A. A. Gaidash, M. I. Blinova, S. A. Aleksandrova, Y. A. Nashchekina, V. K. Krut'ko, O. N. Musskaya, K. V. Skrotskaya, A. V. Nashchekin, N. A. Mikhailova, A. I. Kulak</i>	460
Reaction of CD68 ⁺ , CD45RO ⁺ , and catecholamine-containing spleen cells to the development of a colon tumor in the offspring of splenectomized rat females <i>O. M. Arlashkina, G. Yu. Struchko, L. M. Merkulova, M. N. Mikhailova</i>	474
Functional activity of sodium channels ENaC in human endometrial mesenchymal stem cells <i>A. V. Sudarikova, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin, V. Y. Vasileva, D. V. Lysikova, M. A. Shorokhova, E. A. Morachevskaya, Yu. A. Negulyaev</i>	483
Stability of the human endometrial mesenchymal stem cells karyotype <i>in vitro</i> <i>M. A. Shorokhova, T. M. Grinchuk</i>	491
Use of optically transparent electrodes for the assessment of the erythrocytes quality during their storage <i>A. K. Evseev, A. I. Kolesnikova, I. V. Goroncharovskaya, E. V. Trusova, A. I. Kostin, A. K. Shabanov, M. M. Goldin, S. S. Petrikov</i>	500
In memory of Nikolay Nikolaevich Nikolsky (1931—2021)	509

ХАРАКТЕРИСТИКА ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

© 2021 г. А. Г. Гончаров¹, К. А. Юрова¹, В. В. Шуплецова¹, Н. Д. Газатова¹,
О. Б. Мелашенко¹, Л. С. Литвинова¹, *

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, 236001 Россия

*E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.05.2021 г.

После доработки 31.05.2021 г.

Принята к публикации 05.06.2021 г.

В статье дана краткая характеристика компонентов пуповинной крови (ПК). Рассмотрены варианты применения ПК и ее компонентов, в частности, мезенхимных стволовых клеток, в экспериментальной биологии и медицине для активации регенерации органов и тканей, в составе комплексных мероприятий по лечению хронических заболеваний различного генеза (болезней крови и первичных иммунодефицитов, нейродегенеративных заболеваний, инфаркта миокарда, ожирения, сахарного диабета, цирроза печени, иммунозависимых и аутоиммунных патологий и др.). В обзоре также представлены случаи использования сыворотки (плазмы) ПК в послеоперационном восстановлении, для лечения глазных и нейродегенеративных заболеваний, в терапии возрастных изменений. Описана возможность применения сыворотки (плазмы) ПК в обогащении культуральных сред, для наращивания различных клеточных культур, используемых в регенеративной медицине. Подчеркивается важность и необходимость стандартизации методик получения ПК и ее компонентов, их тестирования и путей введения, а также регулирования использования ПК и ее компонентов в клинической практике. Особое внимание в обзоре уделено использованию ПК и ее компонентов в экспериментальной биологии для моделирования процессов репарации и регенерации органов и тканей у модельных животных.

Ключевые слова: пуповинная кровь, мезенхимные стволовые клетки, полученные из ПК человека, плазма, сыворотка, эритроцитарная масса

DOI: 10.31857/S0041377121050059

Пуповинная кровь (ПК) и ее компоненты находят все более широкое применение в экспериментальной биологии и клинической практике, а также при решении задач регенеративной медицины. В мире зарегистрировано более 450 законченных и действующих клинических исследований с применением ПК и ее компонентов (по данным: <https://clinicaltrials.gov/>). Количество публикаций, напрямую или косвенно посвященных этой тематике, ежегодно составляет около 5500 статей (по данным: pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/). Интерес к ПК исследователей и врачей связан с уникальными свойствами и высоким терапевтическим потенциалом этого биологического материала и относительной доступностью и безопасностью его получения. ПК и ее компоненты можно рассматривать не только как один из наиболее перспективных инструментов регенера-

тивной медицины, но и как средство для лечения ряда гематологических, онкологических и иммунозависимых заболеваний.

В связи с этим, целью настоящего обзора явился анализ публикаций последних лет, посвященных использованию ПК и ее компонентов (эритроцитарной массы, мезенхимных стволовых клеток, сыворотки (плазмы) и др.) в экспериментальной биологии и клинической практике.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПОНЕНТОВ ПК

В ПК присутствуют все форменные элементы крови, характерные для крови новорожденных детей. Однако их количество, соотношение и характеристики отличаются от показателей родившихся детей. Причиной таких отличий является быстрая реакция системы крови на переход от гипоксического внутриутробного развития к внеутробному существованию в условиях гипероксии и гемоконцентрации, связанной с потерей ребенком межтканевой жидкости. Клеточный состав ПК у доношенных де-

Принятые сокращения: ПК – пуповинная кровь; ГСК – гемопоэтические стволовые клетки; МСК – мезенхимные стволовые клетки; СД – сахарный диабет; ФБС – фетальная бычья сыворотка; НУС-МСК – мезенхимные стволовые клетки, полученные из ПК человека; iPS-клетки – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

тей мало зависит от пола ребенка; в то же время количество лейкоцитов и тромбоцитов в ПК существенно выше у детей, рожденных в физиологических родах, по сравнению с кесаревым сечением (Dauber et al., 2011; Танасийчук и соавт., 2017). Рядом авторов установлены значительные вариации содержания гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в ПК от разных доноров, которые связывают с весом новорожденного, степенью зрелости и весом плаценты, количеством родов (Dauber et al., 2011; Танасийчук и соавт., 2017). Важно отметить, что колониеобразующая активность ПК определяется не только количеством CD34⁺-клеток, но и гестационным возрастом плода (Faivre et al., 2018; Mayani et al., 2020).

По показателям красной крови (содержанию эритроцитов, гемоглобина, эритроцитарным индексам), эритроцитарная ПК существенно превосходит как донорскую, так и цельную ПК (Romanov et al., 2019). В эритроцитарной массе ПК присутствуют клетки миелоидного и лимфоидного ряда в количестве, сопоставимом с их содержанием в красном костном мозге. Особенностью мезенхимных стволовых клеток, полученных из ПК человека (HUC-MSC), а также из амниотической мембраны, плаценты, Вартанова студня, являются их высокий пролиферативный потенциал, высокая способность к дифференцировке и самообновлению. В отличие от стволовых клеток, полученных из других источников, или индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS), клеток HUC-MSC не образуют опухоли *in vivo* (Musiał-Wysocka et al., 2019). Низкая экспрессия молекул MHC I и II класса, а также ряда костимулирующих факторов на клеточной мембране, определяют их низкую иммуногенность. Уникальность плазмы (сыворотки) ПК определяется составом входящих в нее компонентов. Так, в плазме ПК отмечены более низкие (относительно обычной донорской плазмы) концентрации провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α), повышенный уровень хемокина IL-8 и ряда факторов роста: M-CSF, HGF, PDGF-BB, SCGF- β , IL-8 и SCF VEGF, G-CSF, EGF, FGF (Ehrhart et al., 2018; Romanov et al., 2019). Такой состав плазмы определяет противовоспалительные, ангиогенные и антиапоптотические свой-

ства этого продукта. Концентрация биологически активных молекул в сыворотке ПК выше по сравнению с плазмой ПК (Caseiro et al., 2018; Romanov et al., 2019). Необходимо отметить, что концентрация отдельных компонентов в плазме ПК достаточно вариативна, что, по-видимому, связано с индивидуальными особенностями донора ПК, способом родоразрешения и др. (Romanov et al., 2019).

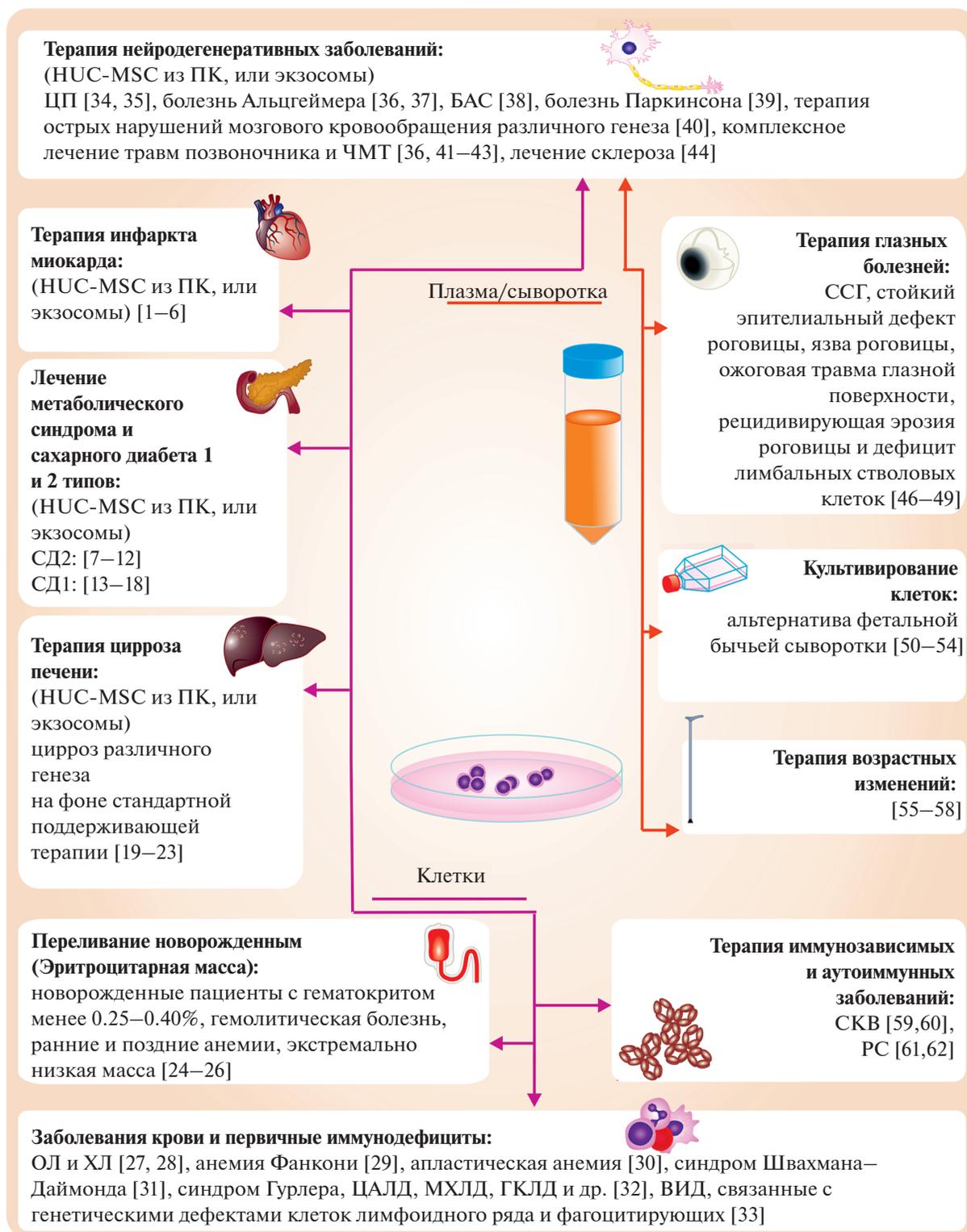
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

ПК и ее компоненты находят широкое применение в области экспериментальной биологии и клинической медицины, благодаря высокому регенераторному и терапевтическому потенциалу компонентов этой биологической жидкости. В частности, эритроцитарная масса ПК используется для аутологичного и аллогенного переливания новорожденным детям, при наличии у них терапевтической или хирургической патологии; гемопоэтические стволовые клетки, полученные из ПК, применяются для лечения заболеваний крови и первичных иммунодефицитов. Кроме того, в ряде работ сообщается об использовании мезенхимных стволовых клеток ПК для терапии ряда нейродегенеративных заболеваний, инфаркта миокарда, ожирения, сахарного диабета, цирроза печени, иммунозависимых и аутоиммунных патологий. Плазма (сыворотка) ПК также широко используется в различных отраслях медицины и экспериментальной биологии: для терапии глазных болезней, нейродегенеративных заболеваний, возрастных изменений, культивирования клеток и др. В контексте рассматриваемой тематики важно подчеркнуть тесное взаимодействие специалистов в области биологии и медицины, поскольку изучение биологических свойств ПК и ее компонентов может помочь в решении ряда клинических проблем.

ПЕРЕЛИВАНИЕ НОВОРОЖДЕННЫМ ПК (ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МАССЫ)

Использование эритроцитарной массы, полученной из ПК, не нашло широкого применения в кли-

Рис. 1. Схема использования пуповинной крови и ее компонентов в экспериментальной биологии и медицине. *Сокращения:* ОЛ – острые лейкозы, ХЛ – хронические лейкозы, ЦАЛД – церебральная аденолейкодистрофия; МХЛД – метахроматическая лейкодистрофия; ГКЛД – глободноклеточная лейкодистрофия; ВИД – врожденные иммунодефициты; ЦП – церебральный паралич; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЧМТ – черепно-мозговая травма; ССГ – синдром сухого глаза; РС – рассеянный склероз; СКВ – системная красная волчанка. *Литература:* 1. Lim et al., 2018; 2. Wang et al., 2018; 3. Ni et al., 2019; 4. Peng et al., 2019; 5. Terashvili, Bosnjak, 2019; 6. Zhao et al., 2019; 7. Li et al., 2013; 8. Reddi et al., 2015; 9. Chen et al., 2016; 10. Pan et al., 2016; 11. Sun et al., 2018; 12. Ulyanova et al., 2018; 13. Park et al., 2012; 14. He et al., 2015; 15. Theil et al., 2015; 16. Jung et al., 2018; 17. Paul et al., 2018; 18. Stiner et al., 2019; 19. Qi et al., 2015; 20. Liang et al., 2017; 21. Mu et al., 2018; 22. Su et al., 2018; 23. Tao et al., 2018; 24. Bianchi et al., 2018; 25. Faivre et al., 2018; 26. Saito-Benz et al., 2020; 27. Algeri et al., 2019; 28. Sakurai et al., 2021; 29. Tuysuz et al., 2019; 30. Ochi et al., 2019; 31. Isaev et al., 2017; 32. Mallhi et al., 2017; 33. Vaillant, Qurie, 2020; 34. McDonald et al., 2018; 35. Okur et al., 2018; 36. Damien, Alan, 2015; 37. Sha et al., 2019; 38. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02881476>; 39. Chen et al., 2020; 40. Venkat et al., 2018; 41. Hua et al., 2016; 42. Hosseini et al., 2016; 43. Bojanic et al., 2020; 44. Ehrhart et al., 2018; 45. Sharma et al., 2011; 47. Anitua et al., 2015; 48. Sona, Jeng, 2016; 49. Giannaccare et al., 2017; 50. Pereira et al., 2014; 51. Wu et al., 2015; 52. Blázquez-Prunera et al., 2017; 53. Caseiro et al., 2018; 54. Pour et al., 2020; 55. Moskalev et al., 2015; 56. Yoo et al., 2016; 57. Castellano et al., 2017; 58. Hu et al., 2019; 59. Ren et al., 2016; 60. Yuan et al., 2019; 61. Rafieemehr et al., 2015; 62. Mehdipour et al., 2019.



нической практике. Ограничениями для применения этого компонента ПК взрослым пациентам являются малые (максимум 2–3 нед.) сроки хранения донорского материала и небольшие объемы эритроцитарной массы (20–40 мл). Однако для новорожденных пациентов, имеющих терапевтическую или хирургическую патологию, лечение которых требует инфузий донорской крови, переливание аутологичной ПК или ее компонентов, позволяет значительно сократить сроки искусственной вентиляции легких, заживления ран, а также пребывания в лечебном учреждении в целом (Sarin et al., 2018; Basile et al., 2019). Предполагают, что эффекты эритроцитарной массы опосредованы не только показателями красной крови ПК, но и высоким содержанием в ней функционально активных иммунных и гемопоэтических стволовых клеток (Basile et al., 2019).

В целом, основным показанием для переливания крови новорожденным являются низкие значения гематокрита (менее 0.25–0.40%) при гемолитической болезни новорожденных, ранних и поздних анемиях у недоношенных детей, а также экстремально низкая масса тела новорожденного и предоперационная подготовка (Bianchi et al., 2018; Faivre et al., 2018; Saito-Benz et al., 2020). Рассматривается возможность аллогенного переливания эритроцитарной массы ПК (Hassall et al., 2015) (рис. 1).

Профессиональными сообществами широко обсуждаются правовые, этические и технические проблемы получения ПК (Munro et al., 2019; Литвинова и др., 2020). В частности, вопросы раннего и позднего пережатия пуповины, доения пуповины для получения большего объема ПК, хранения и стандартизации образцов ПК (Faivre et al., 2018; Nagano et al., 2018; Balasubramanian et al., 2019; Basile et al., 2019; Katheria et al., 2019; Rabe et al., 2019; Литвинова и др., 2020).

Несмотря на оптимистичные результаты, полученные при переливании эритроцитарной массы ПК, остается ряд дискуссионных вопросов, например, о частоте инфузий и объемах переливаемой крови, отдаленных последствиях таких трансфузий (Rudnicki et al., 2015; Lopriore, 2019; Saito-Benz et al., 2020). Кроме того, при переливании ПК и ее компонентов не исключено развитие синдрома острого повреждения легких (TRALI), сопровождающегося острым некардиогенным отеком легких, опосредованным гипоксией (Cho et al., 2020).

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГСК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПК, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРОВИ И ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

ГСК являются плюрипотентными взрослыми стволовыми клетками, способными дифференцироваться в любой тип клеток крови и происходят из покоящихся (дормантных) фибробластоподобных CD34-негативных клеток (Caroog et al., 2020). Гемо-

поэз реализуется в ходе тесного контакта ГСК и стромы костного мозга, включающего как клеточные элементы (макрофагальные и ретикулярные эндотелиальные клетки, стромальные фибробласты, остеобласты), так и элементы внеклеточного матрикса (Roo, Staal, 2020). Под влиянием регуляторных сигналов ряда цитокинов, хемокинов и факторов роста, из ГСК формируются клеточные элементы крови, включая эритроциты, лейкоциты, тромбоциты и т.д. В сложном и непрерывном процессе обновления крови, характеризующимся образованием, развитием и созреванием клеток крови под влиянием ряда этиологических (до конца не установленных) факторов, всегда существует вероятность поломки тонкого механизма передачи наследственной информации. Повреждение ДНК одной кроветворной клетки приводит к появлению клона клеток, не завершивших необходимые этапы дифференцировки (Sjövall, Staffas, 2020; Swierczek, Prchal, 2020; Yokota, 2020).

Показания для пересадки ГСК включают злокачественные новообразования не только кроветворной, но и ряда других тканей, болезни крови, врожденные иммунодефициты, аутоиммунные заболевания и др. и регламентированы приказом Министерства здравоохранения РФ (№ 875н от 12.12.2018) (рис. 1).

Основными источниками ГСК для проведения трансплантации являются костный мозг, ПК и мобилизованная периферическая кровь (Cable et al., 2020; Zhang et al., 2020). Каждый из перечисленных источников имеет свои ограничения, среди которых можно отметить такие, как стоимость, доступность, степень совпадения по HLA-системе, содержание достаточного количества ГСК с высокой функциональной активностью. Успех трансплантации ГСК зависит и от других принципиальных факторов – стадии заболевания, режима миелоабляции, место трансфузии ГСК при трансплантации и др. (Cesaro et al., 2020) (рис. 1).

ПК является одним из доступных источников ГСК для проведения аллотрансплантаций, и редко – аутотрансплантаций (Myers, Miller, 2020). Ведущими факторами, влияющими на качество и количество ГСК в ПК, помимо материнских (возраст, количество беременностей, этническая принадлежность и др.), являются длительность беременности и вес новорожденного (Faivre et al., 2018; Mayani et al., 2020). По сравнению с ГСК, получаемыми из костного мозга, клетки ПК обладают рядом преимуществ: высокое содержание клеток в образце, пролиферативная и колониобразующая активность, а также сниженная экспрессия HLA-антигенов уменьшает риск развития реакции трансплантат против хозяина и обеспечивает низкий риск рецидивов злокачественных новообразований (Milano et al., 2016).

Ограничением в проведении трансплантации ГСК из ПК является недостаточное количество ГСК в одной единице, получаемой при взятии биоматериала, особенно при трансплантации взрослому че-

ловеку весом более 50 кг, невозможность повторно воспользоваться донорским материалом при возникновении первичного или вторичного отторжения. Этот недостаток со временем будет преодолен по мере отработки технологий по наращиванию ГСК пуповинной крови в клинических масштабах *ex vivo* (Mayani et al., 2020; Myers, Miller, 2020; Xue, Milano, 2020).

Кроме того, после трансплантации ГСК из ПК отмечается более позднее (в сравнении с другими источниками ГСК, полученными из тканей взрослых доноров), восстановление кроветворной функции, что может способствовать развитию функциональных осложнений (Kiernan et al., 2017; Cohen et al., 2020).

Описанные результаты клинических исследований, посвященных применению ГСК из ПК, демонстрируют существенный прогресс в лечении злокачественных заболеваний крови – остром и хроническом лейкозах (Algeri et al., 2020; Sakurai et al., 2021). Однако авторы отмечают ограничения применения ГСК, такие как повышенная ранняя смертность и отсроченное восстановление кроветворной и иммунной систем. В то же время другие авторы (Konuma et al., 2016), сравнивая результаты более 2000 трансплантаций стволовых клеток, полученных из разных источников (в том числе из ПК), лицам старше 50 лет с острым миелоидным лейкозом, острым лимфобластным лейкозом или миелодиспластическим синдромом, показали, что итоговые результаты лечения (общая смертность, развития реакции трансплантат против хозяина, безрецидивная выживаемость) были практически такими же. Схожие результаты были ранее описаны в метаанализе результатов более 3300 трансплантаций у пациентов с острым лейкозом (Zhang et al., 2012). Есть мнение, что, существенного улучшения результатов трансплантации ГСК из ПК можно достичь только путем оптимизации методов экспансии клеток *ex vivo*, режимов кондиционирования, применения двойных трансплантатов (Yun et al., 2019).

Применение ГСК для лечения анемии Фанкони впервые было проведено в 1988 г., что послужило основанием для использования этих клеток и при других заболеваниях, связанных с наследственными и приобретенными нарушениями функции кроветворения красного мозга (Tuysuz et al., 2019). Трансплантацию ГСК из ПК успешно применяют при апластических анемиях (Ochi et al., 2019), синдроме Швахмана–Даймонда (Isaev, et al., 2017) (рис. 1).

Оптимистичные результаты клинических исследований по применению генной терапии при серповидно-клеточной анемии и бета-талассемии (Cisneros, Thein, 2020; Shah, Dwivedi, 2020; Soni, 2020) не исключают применения ГСК, в том числе из ПК, как доступный альтернативный вариант терапии этих патологий (Joseph et al., 2018; Foell et al., 2020; Huang, Jiang, 2020). Более того, развитие пренаталь-

ной диагностики наследственных заболеваний и фетальной хирургии позволяют трансплантировать стволовые клетки еще до рождения ребенка. По мнению ряда авторов, такой подход имеет ряд преимуществ, поскольку незрелая иммунная система плода позволяет выживать и размножаться донорским клеткам (Loukogeorgakis et al., 2019; Tai-Macarthur et al., 2020) (рис. 1).

Обнадеживающие результаты получены при использовании ГСК из ПК для лечения ходжкинских и неходжкинских лимфом (Hsu et al., 2018; Sakurai et al., 2021). Особый интерес вызывают сообщения о положительном клиническом опыте применения CAR-трансдуцированных НК-клеток (естественных киллеров), полученных из ПК, для лечения CD19-положительных лимфоидных опухолей (Liu et al., 2020; Kundu et al., 2021) (рис. 1).

Авторы отмечают, что в отличие от CAR-T-клеток, CAR-NK-клетки не вызывают эффектов, связанных с синдромом высвобождения цитокинов (CRS) и нейротоксичности. Однако по мнению тайваньских авторов, преждевременно говорить о положительных результатах, поскольку обнаруженные у пациентов CAR-NK не демонстрируют убедительной экспансии *in vivo* (Li, Huang, 2020).

Существенные положительные результаты по выживаемости и улучшению качества жизни приведены в обзоре, посвященном трансплантации ГСК из ПК при некоторых врожденных нарушениях метаболизма, таких как синдром Гурлера, церебральная аденолейкодистрофия, метахроматическая лейкодистрофия, глобидноклеточная лейкодистрофия и др. (Mallhi et al., 2017). Согласно мнению этих авторов, положительные результаты определяются соответствием HLA на уровне аллелей между трансплантируемыми единицами ПК и донором.

Трансплантация ГСК, полученных из ПК, оказалась эффективной и для некоторых форм врожденных иммунодефицитов, связанных с генетическими дефектами клеток лимфоидного ряда и фагоцитирующих клеток (Vaillant, Qurie, 2020). Однако пересадка ГСК неэффективна, если первичный иммунодефицит опосредован дисрегуляцией развития тимуса, эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта, дефицита некоторых факторов комплемента и др. (Shamriz, Chandrakasan, 2019) (рис. 1).

Как уже упоминалось ранее, существенным преимуществом ГСК из ПК является допустимость неполного соответствия донора и реципиента по системе HLA-антигенов, что особенно важно при необходимости выполнить аллогенную трансплантацию пациенту из группы расовых и национальных меньшинств (Milano et al., 2016; Ruggeri et al., 2016; Xue, Milano, 2020).

Расширение перечня заболеваний, при которых необходима трансплантация ГСК приводит к появлению и внедрению новых технологий, выделения, наращивания различных популяций клеток ПК, что требует проведения широких стандартизированных

рандомизированных плацебо-контролируемых клинических исследований (Xue, Milano, 2020). Важным моментом для развития этого направления является также и доступность образцов ПК для трансплантации. В настоящее время для пациентов гематологического профиля доступны более 730000 единиц ПК (<https://wmnda.info/cord-blood/donate-cord-blood/>; Orlando et al., 2020). По данным Российской ассоциации «РУСКОРД», в международной поисковой базе находится около 4500 образцов ПК для трансплантации из РФ (www.rus-korda.ru).

КЛЕТКИ ПК ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Значительное количество исследований посвящено применению стволовых клеток HUC-MSC для лечения неврологических заболеваний. В литературе описаны случаи интратекального или внутривенного (внутриартериального) введения HUC-MSC при церебральном параличе (McDonald et al., 2018; Okur et al., 2018). Положительный клинический эффект, подтвержденный МРТ головного мозга, авторы связывают с ремоделированием сосудов и восстановлением нейронных сетей, опосредованных противовоспалительными, иммуномодулирующими, ангиогенными, нейротрофическими факторами и антиапоптотическими эффектами внеклеточных везикул (экзосом), секретируемых HUC-MSC (McDonald et al., 2018; Okur et al., 2018; Jiao et al., 2019; Vankeshwaram et al., 2020). В ряде случаев этой категории пациентов для усиления эффекта HUC-MSC вводили в комбинации с гранулоцитарно-колониестимулирующим фактором, эритропоэтином и фактором роста нервных клеток (Rah et al., 2017; Min et al., 2020).

Предполагают, что при болезни Альцгеймера положительный эффект от введения HUC-MSC (Damien, Allan, 2015) также опосредован действием микровезикул, секретируемых HUC-MSC, которые способствуют формированию новых межнейронных синапсов, приводящих к вовлечению в когнитивный или двигательный процесс незадействованных популяций нейронов. В целом, этот механизм работает и при других нейродегенеративных заболеваниях (рис. 1).

В незавершенном клиническом исследовании (<https://clinicaltrials.gov/№ NCT02881476>), интратекальное введение HUC-MSC 43-м пациентам с боковым амиотрофическим склерозом продемонстрировало положительный эффект. Установлено, что экзосомы из HUC-MSC, введенные пациентам с болезнью Паркинсона, усиливают пролиферацию клеток SH-SY5Y, подавляют апоптоз дофаминергических нейронов и повышают уровень дофамина в полостом теле (Chen et al., 2020).

Особый интерес представляют данные об использовании HUC-MSC в терапии острых нарушений мозгового кровообращения различного генеза (Ven-

kat et al., 2018). Так, в экспериментальных и клинических исследованиях доказано, что применение HUC-MSC при ишемическом инсульте значительно снижает неврологический ущерб (Laskowitz et al., 2018; Wang et al., 2019; Surugiu et al., 2019) (рис. 1).

Механизмы действия HUC-MSC при лечении нейротравмы, по-видимому, аналогичны эффектам при терапии острых инсультов. В литературе накопилось много сообщений применении этих клеток в комплексном лечении травм позвоночника и черепно-мозговых травм (Damien, Allan, 2015; Hua et al., 2016; Wojanic et al., 2020). Исследователи отмечают улучшение функциональных показателей задних конечностей крыс при экспериментальной хронической черепно-мозговой травме на фоне введения клеток ПК с гранулоцитарным колониестимулирующим фактом (Acosta et al., 2014; Yeng et al., 2016). В отдельных работах описано значительное клиническое, неврологическое и поведенческое восстановление у лиц, перенесших острую травму спинного мозга, после трансплантации HUC-MSC из ПК человека (Hosseini et al., 2016). Экспериментально продемонстрировано, что при введении HUC-MSC крысам с травматическим поражением головного мозга в нейронах происходит модуляция профилей генов париетальных цитокинов и хемокинов в сторону противовоспалительной реакции, что, по мнению авторов, является основой восстановления и регенерации после нейротравмы (Lin et al., 2019). Отмечая доступность и минимальный риск отторжения HUC-MSC (Venkat et al., 2018), авторы обсуждают эффективность различных вариантов доставки HUC-MSC в очаг поражения при нейродегенеративных заболеваниях (Ehrhart et al., 2018; Hwang et al., 2019).

Отсутствие положительного эффекта или негативный результат при лечении с помощью HUC-MSC цереброваскулярных заболеваний может быть связан как с низкой, так и высокой дозой клеток, их низкой функциональной активностью, тяжелым клиническим течением заболевания и высокой степенью поражения ткани мозга (Laskowitz et al., 2018; Karantanos et al., 2019).

КЛЕТКИ ПК ДЛЯ ТЕРАПИИ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Попытки применения клеток ПК для лечения инфаркта миокарда связаны с ограниченной способностью кардиомиоцитов к функциональному восстановлению и пролиферации после перенесенной острой ишемии (рис. 1).

В клинических и экспериментальных исследованиях показано, что при введении пациентам HUC-MSC из ПК, или экзосом из них, отмечается уменьшение площади инфаркта, снижение степени фиброза миокарда, улучшение сократительной функции желудочков сердца (Lim et al., 2018; Wang et al., 2018;

Ni et al., 2019; Peng et al., 2019; Zhao et al., 2019). Положительный эффект авторы связывают с продукцией клетками HUC-MSC фактора роста сосудов (VEGF), трансформирующего ростового фактора (TGF- β), а также со стимуляцией дифференцировки внутрисердечных и экстракардиальных макрофагов из подтипа M1 в M2 и снижением уровня IL-6 и гаектина-3 в циркуляции.

Однако важно отметить, что положительные эффекты от введения HUC-MSC больным с инфарктом миокарда могут способствовать развитию чрезмерной васкуляризации пораженного участка и образованию гемангиом, опосредованных избыточной секрецией фактора VEGF стволовыми клетками (Teng et al., 2015; Cho et al., 2017).

Кроме того, не существует единого мнения о способе и дозе вводимых пациенту HUC-MSC (Terashvili, Bosnjak, 2019). В перспективе, лечение инфаркта миокарда будет осуществляться не путем трансплантации HUC-MSC, а введением пациентам везикул, получаемых из стволовых клеток различного генеза, предварительно модифицированных для конкретного пациента (Terashvili, Bosnjak, 2019).

КЛЕТКИ ПК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА И САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 И 2 ТИПОВ

Теоретической предпосылкой для терапии метаболического синдрома и сахарного диабета (СД) 2 типа (СД2) компонентами ПК является хроническое воспаление жировой ткани с формированием инсулинорезистентности.

На модели лечения метаболического синдрома у землеройки отмечено существенное снижение содержания глюкозы, липидов и экспрессии провоспалительных цитокинов в крови на фоне роста секреции инсулина и повышения чувствительности тканей (печени, почки, поджелудочной железы) к инсулину после трансплантации HUC-MSC (Pan et al., 2016) (рис. 1).

В литературе широко описано применение HUC-MSC и экзосом, полученных из этих клеток, для лечения СД2 и его осложнений. Авторами описаны различные протоколы, включающие использование клеток в разных концентрациях и внеклеточных везикул, разные пути их введения (внутривенные, внутриартериальные, интрапанкреатические) у лиц с осложненным и не осложненным течением заболевания (Pan et al., 2016). На фоне субъективного улучшения состояния пациентов и уменьшения получаемой дозы инсулина, введение HUC-MSC сопровождалось снижением уровня глюкозы в крови и нормализацией функции β -клеток поджелудочной железы с замедлением разрушения тканей поджелудочной железы. Полученные эффекты исследователи связывают с поляризацией баланса цитокинов в сторону противовоспалительного профиля (IL-4,

IL-6 и TGF- β), регенерацией β -клеток поджелудочной железы, дифференцировкой имплантируемых клеток ПК в инсулинпродуцирующие клетки, увеличением числа регуляторных Т-клеток (Treg) лимфоцитов (Li et al., 2013; Reddi et al., 2015; Chen et al., 2016; Sun et al., 2018; Ulyanova et al., 2018) (рис. 1).

При СД1 целью применения ПК, богатой как стволовыми, так и Treg-клетками, является ремоделирование иммунных процессов в направлении подавления аутореактивных клонов Т-клеток для сохранения и восстановления оставшихся инсулинпродуцирующих клеток (He et al., 2015; Theil et al., 2015; Paul et al., 2018). Трансплантация HUC-MSC пациентам с установленным СД1 способствовала умеренному улучшению метаболических показателей (Cai et al., 2016; Aziz et al., 2019; Stiner et al., 2019). Кроме того, в экспериментальных и клинических работах описано положительное влияние трансплантаций HUC-MSC на течение осложнений СД1: хронической почечной недостаточности, трофических язв (Park et al., 2012; Jung et al., 2018; Stiner et al., 2019).

Негативный эффект от применения HUC-MSC или его отсутствие при лечении СД связывают с низким качеством трансплантированных клеток (неправильными условиями криоконсервации, нарушениим холодовой цепи), наличием у пациентов диабетического кетоацидоза и др. (Li et al. 2019).

Таким образом, применение HUC-MSC открывает серьезные перспективы в лечении СД, однако для широкого внедрения этого метода в клиническую практику требуется серия масштабных рандомизированных исследований, для четкой детализации показаний и противопоказаний к подобной терапии, стандартизации самого метода (включая получение HUC-MSC) и уточнения механизмов его действия.

КЛЕТКИ ПК ДЛЯ ТЕРАПИИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

Современные подходы к терапии цирроза печени базируются на зависимой от этиологии фармакотерапии, диетотерапии и обучении пациентов в специализированных клиниках (Kockerling et al., 2019). Основанием для использования HUC-MSC в терапии цирроза печени служит их высокая способность дифференцироваться в клетки различных типов, в том числе в гепатоциты, секретировать медиаторы с противовоспалительным действием (цитокины, микроРНК, факторы роста и др.) (Su et al., 2018) (рис. 1).

Некоторые исследования продемонстрировали эффективность и безопасность трансплантации HUC-MSC при циррозах, в результате которой было выявлено значительное улучшение функции печени и качества жизни пациентов (Tao et al., 2018; Liang et al., 2017).

На модели фиброза печени крысы было показано, что ядродержащие клетки ПК человека могут

дифференцироваться в гепатоциты, что сопровождается улучшением как биохимических, так и гистопатологических показателей (Zhang et al., 2017; Li et al., 2019; Moon et al., 2019).

В клинических исследованиях, проведенных с участием пациентов с циррозом различного генеза, которым на фоне стандартной поддерживающей терапии были введены HUC-MSC, также отмечены положительные результаты сопровождавшиеся улучшением показателей по шкале Child-Turcotte-Pugh (Qi et al., 2015; Mu et al., 2018; Tao et al., 2018). Таким образом, трансплантация HUC-MSC в сочетании с комплексной базовой терапией цирроза печени может быть многообещающим вариантом лечения таких пациентов. В приведенных источниках указывается, что у части больных эффект был незначительным, но серьезных осложнений авторами не описано. Отмеченные в клинических публикациях летальные исходы, возможно, связаны с трансплантацией клеток больным, находящимся в терминальной стадии заболевания или с сопутствующей патологией. Применение инфузий HUC-MSC требует дальнейших рандомизированных исследований с учетом этиологии заболевания, стадии клинического заболевания и степени поражения печеночной ткани.

КЛЕТКИ ПК ДЛЯ ТЕРАПИИ ИММУНОЗАВИСИМЫХ И АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Применение ПК и ее компонентов при аутоиммунных заболеваниях, в основе патогенеза которых лежит нарушение толерантности к собственным антигенам, определяется противовоспалительными, ангиогенными и антиапоптотическими эффектами этого продукта. Инфузии HUC-MSC при системной красной волчанке (СКВ) сопровождались снижением активности аутовоспалительного процесса, которое связывают с регуляцией баланса клеток Treg/Th17, активацией толерогенных дендритных клеток (ДК), повышением уровня IFN- γ (Yuan et al., 2019; Ren et al., 2016). В целом, применение HUC-MSC при СКВ оказывало длительный (до 5–6 лет) положительный клинический эффект, однако в ряде случаев были отмечены рецидивы заболевания (Meng et al., 2018; Wang et al., 2017) (рис. 1).

Одним из перспективных подходов для стимуляции ремиелинизации при рассеянном склерозе является применение аллогенной трансплантации мезенхимных стволовых клеток, в том числе полученных из ПК. Положительные эффекты применения HUC-MSC связывают не только с продукцией экзосом, содержащих медиаторы регенерации нейронов, но и со способностью этих клеток дифференцироваться в глиальные, продуцирующие миелин (Rafieemehr et al., 2015). В настоящее время проводится более сорока зарегистрированных клинических испытаний по применению HUC-MSC для лечения

различных форм рассеянного склероза (идентификаторы: NCT01364246, NCT02034188, NCT02587715 и др.). Испытания находятся на разных стадиях и носят предварительный характер (Mehdipour et al., 2019).

В клинических исследованиях отмечается безопасность и высокая терапевтическая эффективность инфузий HUC-MSC больным с различными формами рассеянного склероза (РА); то же регистрируется и у экспериментальных животных с РА (Shin et al., 2016; Yu et al., 2019) (рис. 1).

Полученные эффекты обусловлены иммуnoreгуляторным действием HUC-MSC в тканях сустава. В ряде экспериментальных работ показано, что HUC-MSC блокируют активацию инфламасом, индуцируют развитие клеток Treg, что сопровождается снижением содержания факторов с провоспалительным действием (IL-6, TNF- α , TGF- β , NF- κ B, TLR-2, MMP-3, COMP-1 и RF) в тканях, улучшением антиоксидантного профиля и повышенной продукцией противовоспалительного медиатора IL-10 (Sun et al., 2017; Abdelmawgoud, Saleh, 2018). Приведенные результаты требуют дополнительных исследований безопасности, побочных и отдаленных эффектов, стандартов качества, частоты и доз вводимых клеток.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМЫ (СЫВОРОТКИ) ПК

Несмотря на значительную вариабельность состава плазмы (сыворотки) пуповинной крови и сложность стандартизации, ее клиническое применение находит все более широкое распространение в самых различных отраслях медицинской практики.

Терапия глазных болезней. В клинике плазму ПК используют в терапии различных заболеваний глазной поверхности, включая синдром сухого глаза, стойкий эпителиальный дефект роговицы, язву роговицы, ожоговую травму глазной поверхности, рецидивирующую эрозию роговицы и дефицит лимбальных стволовых клеток (Sharma et al., 2011; Soni, Jeng, 2016). Механизм действия глазных капель на основе плазмы ПК определяется высокой концентрацией в них факторов роста и цитокинов, стимулирующих пролиферацию и миграцию клеток поверхности глаза (Giannaccare et al., 2017). Так, применение плазмы ПК, богатой факторами роста, стимулировало восстановление роговицы глаза без рубцов, по сравнению с аутологичной сывороткой (Anitua et al., 2015). Кроме того, капли, приготовленные на основе сыворотки ПК, обладают бактериостатическим действием, благодаря высокому содержанию в них IgG, лизоцима и компонентов системы комплемента (Yoon, 2014). Описаны положительные клинические эффекты по использованию глазных капель на основе лизата тромбоцитов, полученных из ПК (Soni, Jeng, 2016) (рис. 1).

К положительным результатам терапии плазмой, полученной из ПК, относятся быстрое заживление послеоперационных ран, эффективное восстановление поверхности глаза, высокая пролиферация бокаловидных клеток, улучшение показателей чувствительности роговицы и уменьшение помутнения, сокращение сроков лечения и др. (Bernabei et al., 2019). При назначении необходимо учитывать состояние пациента, форму и степень поражения глазной поверхности (Giannaccare et al., 2017). Несмотря на несомненные успехи применения глазных капель на основе плазмы ПК, не решенным остается ряд вопросов, недавно сформулированных (Bernabei et al., 2019). Предметом обсуждения являются процедуры заготовки, стандартизации, показания к терапии, длительность курсов и др.

По мнению упомянутых авторов, для внедрения таких препаратов в клиническую практику, потребуются значительная междисциплинарная работа с проведением рандомизированных контролируемых испытаний (Bernabei et al., 2019).

Терапия возрастных изменений. С начала 2000-х годов в литературе появилась еще одна потенциальная область применения плазмы ПК. Обнаружено, что переливание плазмы ПК старым животным, в отличие от переливания им плазмы молодых животных, не только вызывает омолаживающий эффект, но и способствует нейрогенезу, улучшению функций гиппокампа, повышению обучаемости и восстановлению памяти (Castellano et al., 2017).

Предполагают, что стимулирующее действие плазмы ПК обусловлено, как уже упоминалось ранее, наличием в ней ростовых факторов и разнообразных сигнальных молекул, обеспечивающих рост и развитие плода. На роль таких факторов претендует более десятка молекул, например белок TIMP2 (тканевой ингибитор металлопротеиназы 2), GDF-11 (фактор тканевой дифференцировки 11) и др. (Moskalev et al., 2015; Castellano et al., 2017). В качестве носителей биоактивных молекул могут выступать и экзосомы, которые обладают терапевтическим эффектом, доставляя в ткани микроРНК (miRNA) (Hu et al., 2019) (рис. 1).

Логично предположить, что экспериментальные работы послужат основой для клинических разработок в этом направлении. Однако в настоящее время зарегистрировано всего два клинических исследования, посвященных безопасности и эффективности применения плазмы ПК для улучшения качества жизни пожилых лиц (<https://clinicaltrials.gov/>). Оба исследования не завершены, их результаты не опубликованы (Yoo et al., 2016).

Терапия нейродегенеративных заболеваний. Обнадеживающие результаты получены при использовании плазмы (сыворотки) ПК в лечении ряда нейродегенеративных заболеваний. На мышинной модели болезни Альцгеймера введение плазмы ПК оказывало положительное действие, проявляющееся в уменьше-

нии количества β -амилоидных бляшек, улучшении когнитивных функций (Habib et al., 2018) и восстановлении функций гиппокампа (Middeldorp et al., 2016; Castellano et al., 2017) (рис. 1).

На модели болезни Паркинсона после введения плазмы ПК описано улучшение выживаемости дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (SNpc) (Lee et al., 2019). Полученные положительные эффекты авторы связывают не только с высокой концентрацией в плазме ПК спектра противовоспалительных цитокинов и факторов роста, но и с описанным в эксперименте *in vitro* эффектом снижения апоптотической гибели и увеличением жизнеспособности мононуклеарных клеток, полученных от больных боковым амиотрофическим склерозом (Ehrhart et al., 2018). Таким образом, плазма (сыворотка) ПК является перспективным средством, обладающим высоким потенциалом для лечения нейродегенеративных заболеваний (рис. 1).

Однако клинические испытания с применением плазмы ПК в этой отрасли медицины пока немногочисленны. В клиническом исследовании (NCT022563060) на небольшой выборке пациентов с болезнью Альцгеймера продемонстрирована относительно хорошая переносимость инфузии плазмы ПК. Однако на фоне улучшения навыков повседневной жизни, улучшения познавательных способностей пациентов не происходило, эффект от плазмы молодых доноров (18–30 лет) был более выраженным (Sha et al., 2019). По-видимому, наиболее перспективным подходом для лечения нейродегенеративных заболеваний в составе комплексной фармакологической коррекции будет применение плазмы ПК вместе с клетками ПК, в частности, использование плазмы ПК в качестве буферного раствора для клеток ПК перед введением пациентам, которое может повысить жизнеспособность клеток и, соответственно, усилить терапевтическое действие при лечении склероза (Ehrhart et al., 2018). Несмотря на очевидные возможности применения плазмы ПК в клинике нейродегенеративных заболеваний, ее широкое применение потребует проведения больших рандомизированных клинических исследований.

Культивирование клеток. В регенеративной медицине использование сыворотки и лизата тромбоцитов из ПК находит все более широкое применение в связи с поиском оптимального состава сред для культивирования клеток, предназначенных для клинического применения, и не содержащих ксеногенных компонентов (рис. 1).

Высокие концентрации растворимых факторов роста в плазме ПК позволяют рассматривать ее в качестве альтернативы традиционно применяемой при культивировании клеток фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Pereira et al., 2014). Проведен сравнительный анализ состава плазмы ПК и ФБС (Casseiro et al., 2018). Отмечено, что в плазме ПК регистрируется более высокий уровень глюкозы и более

низкое содержание глутамата, лактата и аминокислот аланина, лейцина, изолейцина и валина. По уровню протеиногенных аминокислот, нуклеотидов, и липидов эти добавки к культуральным средам мало отличаются (Caseiro et al., 2018). Плазму ПК предлагается использовать в качестве добавки к среде, не содержащей сыворотку животных, для роста, поддержания и дифференциации как клеток ПК, так и других МСК для наращивания этих клеток в клинических масштабах (Wu et al., 2015; Blázquez-Prunera et al., 2017; Pour et al., 2020).

Добавление в бессывороточную среду плазмы ПК вместо ФБС позволило добиться значительного роста эндотелиальных клеток *in vitro*, что расширяет возможности их терапевтического применения (Huang et al., 2011; Pereira et al., 2014). При использовании сыворотки ПК в комбинации с сывороточным альбумином человека описано существенное увеличение кратности CD34⁺-клеток, по сравнению с применением ФБС (Kwok et al., 2007). Другие авторы, напротив, не отмечают заметных отличий пролиферативной активности и других характеристиках клеток ПК при добавлении плазмы ПК вместо ФБС в культуральную среду с МСК (Ding et al., 2013) (рис. 1).

Однако в целом, публикации о применении плазмы (сыворотки) ПК при культивировании клеток свидетельствуют о ее существенных преимуществах: доступности, относительной безопасности для культивирования, наращивания и последующего клинического применения МСК (Pour et al., 2020). Кроме того, известен факт, что ФБС потенциально может передавать зоонозные заболевания (в том числе прионные), а также вызывать иммунные реакции на ее компоненты (Maskensen et al., 2000). Поскольку конечной целью исследований в этой области является применение клеток для трансплантации пациентам, то принципиальным остается вопрос о безопасном применении такого продукта (например, риск инфекционного заражения) (Caseiro et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимистичные результаты приведенных экспериментальных и клинических исследований применения ПК и ее компонентов требуют критического и осторожного рассмотрения перед широким внедрением этих методов в клинику. Необходимы дальнейшие исследования возможных механизмов действия, стандартизация протоколов получения и введения ПК. Необходимо четко стандартизировать методы получения и тестирования компонентов ПК — плазмы, эритроцитарной массы и качества клеток. Безусловно, необходимо проведение тщательного анализа отдаленных результатов и возможных осложнений после применения ПК и ее компонентов в клинической практике. Кроме того, в Российской Федерации, на сегодняшний день, нет надлежащей нормативно-правовой базы по обращению пуповинной крови и ее компонентов, что является сдерживающим фак-

тором развития клеточных технологий и регенеративной медицины и внедрения научных исследований в клиническую практику. Возможно, что созданная в 2019 г. в РФ ассоциация специалистов и организаций в области заготовки, хранения, применения клеток ПК и клеточных технологий “РУСКОРД” поможет преодолеть отставание в этой области. Задача ассоциации — формирование консолидированного профессионального (экспертного) мнения специалистов по вопросам стратегического развития и разработки российских стандартов для сбора, процессинга, хранения и выдачи ПК для применения, разработка и утверждение клинических рекомендаций (протоколов) по применению клеточных технологий (www.ruscord.ru).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-14015/19 мк), а также государственной поддержке ведущих научных школ РФ (НШ-2495.2020.7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Литвинова Л.С., Гончаров А.Г., Шуплецова В.В., Газатова Н.Д., Мелашенко О.Б., Юрова К.А., Пестрикова А.А. 2020. Анализ правового регулирования обращения пуповинной крови и ее компонентов в Российской Федерации и за рубежом. *Гены и Клетки*. Т. 15. № 4. С. 88. (Litvinova L.S., Goncharov A.G., Shupletsova V.V., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Yurova K.A., Pestrikova A.A. 2020. Analysis of the legal regulation of the use of umbilical cord blood and its components in the Russian federation and abroad. *Genes & Cells*. V. 15. P. 88. <https://doi.org/10.23868/202012014>)
- Танасийчук И.С., Михайленко Л.П., Маланчук О.Н., Фетисова О.А. 2017. Общий анализ пуповинной крови как возможного источника гемопоэтических стволовых клеток. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. Т. 6(3). С. 380. (Tanasiychuk I.S., Mikhailenko L.P., Malanchuk O.N., Fetisova O.A. 2017. General analysis of cord blood as a possible source of hematopoietic stem cells. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. V. 6. P. 380). <https://docplayer.ru/71738670-Obshchiy-analiz-pupovinnoy-krovi-kak-vozmozhnogo-istochnika-gemopoieticheskikh-stvolovykh-kletok.html>
- Abdelmawgoud H., Saleh A. 2018. Anti-inflammatory and antioxidant effects of mesenchymal and hematopoietic stem cells in a rheumatoid arthritis rat model. *Adv. Clin. Exp. Med*. V. 27. P. 873. <https://doi.org/10.17219/acem/73720>

- Acosta S.A., Tajiri N., Shinozuka K., Ishikawa H., Sanberg P.R., Sanchez-Ramos J., Song S., Kaneko Y., Borlongan C.V.* 2014. Combination therapy of human umbilical cord blood cells and granulocyte colony stimulating factor reduces histopathological and motor impairments in an experimental model of chronic traumatic brain injury. *PLoS One*. V. 9. e90953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090953>
- Algeri M., Gaspari S., Locatelli F.* 2020. Cord blood transplantation for acute leukemia. *Expert Opin. Biol. Ther.* V. 20. P. 1223. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1782380>
- Anitua E., de la Fuente M., Muruzabal F., Riestra A., Merayo-Llaves J., Orive G.* 2015. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp. Eye Res.* V. 135. P. 118. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.016>
- Aziz J., Liao G., Adams Z., Rizk M., Shorr R., Allan D.S.* 2019. Systematic review of controlled clinical studies using umbilical cord blood for regenerative therapy: Identifying barriers to assessing efficacy. *Cytotherapy*. V. 21. P. 1112. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.004>
- Balasubramanian H., Malpani P., Sindhur M., Kabra N.S., Ahmed J., Srinivasan L.* 2019. Effect of umbilical cord blood sampling versus admission blood sampling on requirement of blood transfusion in extremely preterm infants: A randomized controlled trial. *J. Pediatr.* V. 211. P. 39. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2019.04.033>
- Basile S., Pinelli S., Micelli E., Caretto M., Panici P.B.* 2019. Milking of the umbilical cord in term and late preterm infants. *Biomed. Res. Int.* V. 2019. P. 9185059. <https://doi.org/10.1155/2019/9185059>
- Bernabei F., Roda M., Buzzi M., Pellegrini M., Giannaccare G., Versura P.* 2019. Blood-based treatments for severe dry eye disease: The need of a consensus. *J. Clin. Med.* V. 8. P. 1478. <https://doi.org/10.3390/jcm8091478>
- Bianchi M., Papacci P., Valentini C.G., Barbagallo O., Vento G., Teofili L.* 2018. Umbilical cord blood as a source for red-blood-cell transfusion in neonatology: a systematic review. *Vox Sang.* V. 113. P. 713. <https://doi.org/10.1111/vox.12720>
- Blázquez-Prunera A., Díez J.M., Gajardo R., Grancha S.* 2017. Human mesenchymal stem cells maintain their phenotype, multipotentiality, and genetic stability when cultured using a defined xeno-free human plasma fraction. *Stem Cell Res. Ther.* V. 8. P. 103. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0552-z>
- Bojanic C., To K., Zhang B., Mak C., Khan W.S.* 2020. Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in peripheral nerve regeneration. *World J. Stem Cells*. V. 12. P. 288. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i4.288>
- Cable J., Fuchs E., Weissman I., Jasper H., Glass D., Rando T.A., Blau H., Debnath S., Oliva A., Park S., Passegué E., Kim C., Krasnow M.A.* 2020. Adult stem cells and regenerative medicine—a symposium report. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* V. 1462. P. 27. <https://doi.org/10.1111/nyas.14243>
- Cai J., Wu Z., Xu X., Liao L., Chen J., Huang L., Wu W., Luo F., Wu C., Pugliese A., Pileggi A., Ricordi C., Tan J.* 2016. Umbilical cord mesenchymal stromal cell with autologous bone marrow cell transplantation in established type 1 diabetes: a pilot randomized controlled open-label clinical study to assess safety and impact on insulin secretion. *Diabetes Care*. V. 39. P. 149. <https://doi.org/10.2337/dc15-0171>
- Caseiro A.R., Ivanova G., Pedrosa S.S., Branquinho M.V., Georgieva P., Barbosa P.P., Santos J.D., Magalhães R., Teixeira P., Pereira T., Maurício A.C.* 2018. Human umbilical cord blood plasma as an alternative to animal sera for mesenchymal stromal cells in vitro expansion — a multicomponent metabolomic analysis. *PLoS One*. V. 13(10). e0203936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203936>
- Castellano J.M., Mosher K.I., Abbey R.J., McBride A.A., James M.L., Berdnik D., Shen J.C., Zou B., Xie X.S., Tingle M., Hinkson I.V., Angst M.S., Wyss-Coray T.* 2017. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature*. V. 544. P. 488. <https://doi.org/10.1038/nature22067>
- Cesaro S., Pillon M., Sauer M., Smiers F., Faraci M., de Heredia C.D., Wynn R., Greil J., Locatelli F., Veys P., Uytebroeck A., Ljungman P., Chevalier P., Ansari M., Badell I. et al.* 2020. Long-term outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Shwachman–Diamond syndrome: A retrospective analysis and a review of the literature by the Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Society for blood and marrow transplantation (SAAWP-EBMT). *Bone Marrow Transplant.* V. 55. P. 1796. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-0901-x>
- Chen H.X., Liang F.C., Gu P., Xu B.L., Xu H.J., Wang W.T., Hou J.Y., Xie D.X., Chai X.Q., An S.J.* 2020. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy. *Cell Death. Dis.* V. 11. P. 288. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2473-5>
- Chen P., Huang Q., Xu X.J., Shao Z.L., Huang L.H., Yang X.Z., Guo W., Li C.M., Chen C.* 2016. The effect of liraglutide in combination with human umbilical cord mesenchymal stem cells treatment on glucose metabolism and β cell function in type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. V. 55. P. 349. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2016.05.004>
- Cho H.-M., Kim P.-H., Chang H.-K., Shen Y.-M., Bonsra K., Kang B.-J., Yum S.-Y., Kim J.-H., Lee S.-Y., Choi M.-C., Kim H.H., Jang G., Cho J.-Y.* 2017. Targeted genome engineering to control VEGF expression in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells: Potential implications for the treatment of myocardial infarction. *Stem Cells Transl. Med.* V. 6. P. 1040. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0114>
- Cho M.S., Modi P., Sharma S.* 2020. Transfusion-related acute lung injury (TRALI). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507846/>
- Cisneros G.S., Thein S.L.* 2020. Recent advances in the treatment of sickle cell disease. *Front. Physiol.* V. 11. P. 435. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00435>
- Cohen S., Roy J., Lachance S., Delisle J.S., Marinier A., Busque L., Roy D.C., Barabé F., Ahmad I., Bambace N., Bernard L., Kiss T., Bouchard P., Caudrelier P., Landais S., Larochelle F. et al.* 2020. Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1-2 safety and feasibility study. *Lancet Haema-*

- tol. V. 7. e134.
[https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30202-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30202-9)
- Damien P., Allan D.S.* 2015. Regenerative therapy and immune modulation using umbilical cord blood-derived cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 21. P. 1545.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.05.022>
- Dauber K., Becker D., Odendahl M., Seifried E., Bonig H., Tonn T.* 2011. Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: Results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit. *Cytotherapy.* V. 13. P. 449.
<https://doi.org/10.3109/14653249.2010.529894>
- Ding Y., Lu Z., Yuan Y., Wang X., Li D., Zeng Y.* 2013. Comparison of human cord blood mesenchymal stem cell culture between using human umbilical cord plasma and using fetal bovine serum. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* V. 30. P. 1279. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24645612/>
- Ehrhart J., Sanberg P.R., Garbuzova-Davis S.* 2018. Plasma derived from human umbilical cord blood: Potential cell-additive or cell-substitute therapeutic for neurodegenerative diseases. *J. Cell Mol. Med.* V. 22. P. 6157.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13898>
- Faivre L., Couzin C., Boucher H., Domet T., Desproges A., Sibony O., Bechard M., Vanneaux V., Larghero J., Cras A.* 2018. Associated factors of umbilical cord blood collection quality. *Transfusion.* V. 58. P. 520.
<https://doi.org/10.1111/trf.14447>
- Foell J., Kleinschmidt K., Jakob M., Troeger A., Corbacioglu S.* 2020. Alternative donor: $\alpha\beta$ /CD19 T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* V. 13. P. 98.
<https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2019.12.006>
- Giannaccare G., Versura P., Buzzi M., Primavera L., Pellegrini M., Campos E.C.* 2017. Blood derived eye drops for the treatment of cornea and ocular surface diseases. *Transfus. Apher. Sci.* V. 56. P. 595.
<https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.07.023>
- Habib A., Hou H., Mori T., Tian J., Zeng J., Fan S., Giunta B., Sanberg P.R., Sawmiller D., Tan J.* 2018. Human umbilical cord blood serum-derived α -secretase: functional testing in Alzheimer's disease mouse models. *Cell Transplant.* V. 27. P. 438.
<https://doi.org/10.1177/0963689718759473>
- Hassall O.W., Thitiri J., Fegan G., Hamid F., Mwarumba S., Denje D., Wambua K., Mandaliya K., Maitland K., Bates I.* 2015. Safety and efficacy of allogeneic umbilical cord red blood cell transfusion for children with severe anaemia in a Kenyan hospital: an open-label single-arm trial. *Lancet Haematol.* V. 2. e101.
[https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00005-8)
- He B., Li X., Yu H., Zhou Z.* 2015. Therapeutic potential of umbilical cord blood cells for type 1 diabetes mellitus. *J. Diabetes.* V. 7. P. 762.
<https://doi.org/10.1111/1753-0407.12286>
- Hosseini S.R., Kaka G., Joghataei M.T., Hooshmandi M., Sadraie S.H., Yaghoobi K., Mohammadi A.* 2016. Assessment of Neuroprotective Properties of *Melissa officinalis* in combination with human umbilical cord blood stem cells after spinal cord injury. *ASN Neuro.* V. 8. P. 1759091416674833.
<https://doi.org/10.1177/1759091416674833>
- Hsu J., Artz A., Mayer S.A., Guarner D., Bishop M.R., Reich-Slotky R., Smith S.M., Greenberg J., Kline J., Ferrante R., Phillips A.A., Gergis U., Liu H., Stock W., Cushing M. et al.* 2018. Combined haploidentical and umbilical cord blood allogeneic stem cell transplantation for high-risk lymphoma and chronic lymphoblastic leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 24. P. 359.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.10.040>
- Hu Y., Xu R., Chen C.-Y., Rao S.-S., Xia K., Huang J., Yin H., Wang Z.-X., Cao J., Liu Z.-Z., Tan Y.-J., Luo J., Xie H.* 2019. Extracellular vesicles from human umbilical cord blood ameliorate bone loss in senile osteoporotic mice. *Metabolism.* V. 95. P. 93.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.01.009>
- Hua R., Li P., Wang X., Yang J., Zheng P., Niu X., Li Y., An Y.* 2016. Evaluation of somatosensory evoked potential and pain rating index in a patient with spinal cord injury accepted cell therapy. *Pain Physician.* V. 19. E659.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27228535/>
- Huang C.W., Jiang H.* 2020. Research advances in transplantation for thalassemia major. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* V. 22. P. 77. <http://www.zgd-ddek.com/EN/Y2020/V22/I1/77>
- Huang L., Critser P.J., Grimes B.R., Yoder M.C.* 2011. Human umbilical cord blood plasma can replace fetal bovine serum for in vitro expansion of functional human endothelial colony-forming cells. *Cytotherapy.* V. 13. P. 712.
<https://doi.org/10.3109/14653249.2010.548380>
- Hwang S., Choi J., Kim M.* 2019. Combining human umbilical cord blood cells with erythropoietin enhances angiogenesis/neurogenesis and behavioral recovery after stroke. *Front. Neurol.* V. 10. P. 357.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00357>
- Isaev A.A., Deev R.V., Kuliev A., Plaxa I.L., Stancheva N.V., Borovkova A.S., Potapov I.V., Pomerantseva E.A., Chogovadze A.G., Boyarsky K.Y., Semenenko A.E., Mikhailov A.V., Shevchenko K.G., Prikhodko A.V., Rechiisky S. et al.* 2017. First experience of hematopoietic stem cell transplantation treatment of Shwachman-Diamond syndrome using unaffected HLA-matched sibling donor produced through preimplantation HLA typing. *Bone Marrow Transplant.* V. 52. P. 1249.
<https://doi.org/10.1038/bmt.2017.46>
- Jiao Y., Li X.Y., Liu J.* 2019. A new approach to cerebral palsy treatment: discussion of the effective components of umbilical cord blood and its mechanisms of action. *Cell Transplant.* V. 28. P. 497.
<https://doi.org/10.1177/0963689718809658>
- Joseph J.J., Abraham A.A., Fitzhugh C.D.* 2018. When there is no match, the game is not over: Alternative donor options for hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease. *Semin. Hematol.* V. 55. P. 94.
<https://doi.org/10.1053/j.seminmatol.2018.04.013>
- Jung J.-A., Yoon Y.-D., Lee H.-W., Kang S.-R., Han S.-K.* 2018. Comparison of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells with healthy fibroblasts on wound-healing activity of diabetic fibroblasts. *Int. Wound J.* V. 15. P. 133.
<https://doi.org/10.1111/iwj.12849>
- Kapoor S., Shenoy S.P., Bose B.* 2020. CD34 cells in somatic, regenerative and cancer stem cells: Developmental biology, cell therapy, and omics big data perspective. *J. Cell Bio-*

- chem. V. 121. P. 3058.
<https://doi.org/10.1002/jcb.29571>
- Karantanos T., Kim H.T., Tijaro-Ovalle N.M., Li L., Cutler C., Antin J.H., Ballen K., Marty F.M., Tan C.S., Ritz J., Politikos I., Boussioutis V.* 2019. Reactivation of BK virus after double umbilical cord blood transplantation in adults correlates with impaired reconstitution of CD4+ and CD8+ T effector memory cells and increase of T regulatory cells. *Clin. Immunol.* V. 207. P. 18.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.06.010>
- Katheria A., Reister F., Essers J., Mendler M., Hummler H., Subramaniam A., Carlo W., Tita A., Truong G., Davis-Nelson S., Schmölzer G., Chari R., Kaempf J., Tomlinson M., Yanowitz T. et al.* 2019. Association of umbilical cord milking vs delayed umbilical cord clamping with death or severe intraventricular hemorrhage among preterm infants. *JAMA.* V. 322. P. 1877. DOI 10.1001 / jama.2019.16004
- Kiernan J., Damien P., Monaghan M., Shorr R., McIntyre L., Fergusson D., Tinmouth A., Allan D.* 2017. Clinical studies of ex vivo expansion to accelerate engraftment after umbilical cord blood transplantation: A systematic review. *Transfus. Med. Rev.* V. 31. P. 173.
<https://doi.org/10.1016/j.tmr.2016.12.004>
- Kockerling D., Nathwani R., Forlano R., Manousou P., Mullish B.H., Dhar A.* 2019. Current and future pharmacological therapies for managing cirrhosis and its complications. *World J. Gastroenterol.* V. 25. P. 888.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i8.888>
- Konuma T., Tsukada N., Kanda J., Uchida N., Ohno Y., Miyakoshi S., Kanamori H., Hidaka M., Sakura T., Onizuka M., Kobayashi N., Sawa M., Eto T., Matsuhashi Y., Kato K. et al.* 2016. Donor/Source Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Comparison of transplant outcomes from matched sibling bone marrow or peripheral blood stem cell and unrelated cord blood in patients 50 years or older. *Am. J. Hematol.* V. 91. E284.
<https://doi.org/10.1002/ajh.24340>
- Kundu S., Gurney M., O'Dwyer M.* 2021. Generating natural killer cells for adoptive transfer: Expanding horizons. *Cytotherapy.* S1465.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.12.002>
- Kwok Y.K., Tang M.H., Law H.K., Ngai C.S., Lau Y.L., Lau E.T.* 2007. Maternal plasma or human serum albumin in wash buffer enhances enrichment and ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* V. 137. P. 468.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06606.x>
- Laskowitz D.T., Bennett E.R., Durham R.J., Volpi J.J., Wiese J.R., Frankel M., Shpall E., Wilson J.M., Troy J., Kurtzberg J.* 2018. Allogeneic umbilical cord blood infusion for adults with ischemic stroke: Clinical outcomes from a phase I safety study. *Stem Cells Transl. Med.* V. 7. P. 521.
<https://doi.org/10.1002/sctm.18-0008>
- Lee J.Y., Tuazon J.P., Ehrhart J., Sanberg P.R., Borlongan C.V.* 2019. Gutting the brain of inflammation: A key role of gut microbiome in human umbilical cord blood plasma therapy in Parkinson's disease model. *J. Cell Mol. Med.* V. 23. P. 5466.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14429>
- Li B., Cheng Y., Yu S., Zang L., Yin Y., Liu J., Zhang L., Mu Y.* 2019. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in obese type 2 diabetic mice. *Stem Cells Int.* V. 2019. P. 8628027.
<https://doi.org/10.1155/2019/8628027>
- Li C., Huang B.* 2020. CAR-transduced natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* V. 382. P. 1865.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc2004226>
- Li X.-Y., Zheng Z.-H., Li X.-Y., Guo J., Zhang Y., Li H., Wang Y.-W., Ren J., Wu Z.-B.* 2013. Treatment of foot disease in patients with type 2 diabetes mellitus using human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: Response and correction of immunological anomalies. *Curr. Pharm. Des.* V. 19. P. 4893.
<https://doi.org/10.2174/13816128113199990326>
- Liang J., Zhang H., Zhao C., Wang D., Ma X., Zhao S., Wang S., Niu L., Sun L.* 2017. Effects of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of liver cirrhosis caused by autoimmune diseases. *Int. J. Rheum. Dis.* V. 20. P. 1219.
<https://doi.org/10.1111/1756-185X.13015>
- Lim M., Wang W., Liang L., Han Z.B., Li Z., Geng J., Zhao M., Jia H., Feng J., Wei Z., Song B., Zhang J., Li J., Liu T., Wang F. et al.* 2018. Intravenous injection of allogeneic umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells reduces the infarct area and ameliorates cardiac function in a porcine model of acute myocardial infarction. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 129.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0888-z>
- Lin C.-H., Lin W., Su Y.-C., Hsuan Y.C.-Y., Chen Y.-C., Chang C.-P., Chou W., Lin K.-C.* 2019. Modulation of parietal cytokine and chemokine gene profiles by mesenchymal stem cell as a basis for neurotrauma recovery. *Formos. Med. Assoc.* V. 118. P. 1661.
<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2019.01.008>
- Liu E., Marin D., Banerjee P., Macapinlac H.A., Thompson P., Basar R., Nassif Kerbauly L., Overman B., Thall P., Kaplan M., Nandivada V., Kaur I., Nunez Cortes A., Cao K., Daher M. et al.* 2020. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N. Engl. J. Med.* V. 382. P. 545.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>
- Lopriore E.* 2019. Updates in red blood cell and platelet transfusions in preterm neonates. *Am. J. Perinatol.* V. 36. S37.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1691775>
- Loukogeorgakis S.P., Shangaris P., Bertin E., Franzin C., Piccoli M., Pozzobon M., Subramanian S., Tedeschi A., Kim A.G., Li H., Fachin C.G., Dias A.I.B.S., Stratigis J.D., Ahn N.J., Thrasher A.J. et al.* 2019. In utero transplantation of expanded autologous amniotic fluid stem cells results in long-term hematopoietic engraftment. *Stem Cells.* V. 37. P. 1176.
<https://doi.org/10.1002/stem.3039>
- Mackensen A., Dräger R., Schlesier M., Mertelsmann R., Lindemann A.* 2000. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* V. 49. P. 152.
<https://doi.org/10.1007/s002620050614>
- Mallhi K.K., Smith A.R., DeFor T.E., Lund T.C., Orchard P.J., Miller W.P.* 2017. Allele-level HLA matching impacts key outcomes following umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 23. P. 119.
- Mayani H., Wagner J.E., Broxmeyer H.E.* 2020. Cord blood research, banking, and transplantation: achievements, chal-

- lenges, and perspectives. *Bone Marrow Transplant.* V. 55. P. 48.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.10.019>
- McDonald C.A., Fahey M.C., Jenkin G., Miller S.L. 2018. Umbilical cord blood cells for treatment of cerebral palsy; timing and treatment options. *Pediatr. Res.* V. 83. P. 333.
<https://doi.org/10.1038/pr.2017.236>
- Mehdipour A., Ebrahimi A., Shiri-Shahsavari M.-R., Soleimani-Rad J., Roshangar L., Samiei M., Ebrahimi-Kalan A. 2019. The potentials of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis. *Rev. Neurosci.* V. 30. P. 857.
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0057>
- Meng M., Liu Y., Wang W., Wei C., Liu F., Du Z., Xie Y., Tang W., Hou Z., Li Q. 2018. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of multiple sclerosis. *Am. J. Transl. Res.* V. 10. P. 212. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29423006/>
- Middeldorp J., Lehallier B., Villeda S.A., Miedema S.S.M., Evans E., Czjir E., Zhang H., Luo J., Stan T., Mosher K.I., Masliah E., Wyss-Coray T. 2016. Preclinical assessment of young blood plasma for Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* V. 73. P. 1325.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3185>
- Milano F., Gooley T., Wood B., Woolfrey A., Flowers M.E., Doney K., Witherspoon R., Mielcarek M., Deeg J.H., Sorrow M., Dahlberg A., Sandmaier B.M., Salit R., Petersdorf E., Appelbaum F.R., Delaney C. 2016. Cord-blood transplantation in patients with minimal residual disease. *N. Engl. J. Med.* V. 375. P. 944.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602074>
- Min K., Suh M.R., Cho K.H., Park W., Kang M.S., Jang S.J., Kim S.H., Rhie S., Choi J.I., Kim H.J., Cha K.Y., Kim M. 2020. Potentiation of cord blood cell therapy with erythropoietin for children with CP: A 2 × 2 factorial randomized placebo-controlled trial. *Stem Cell Res. Ther.* V. 11. P. 509.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-02020-y>
- Moon S.H., Lee C.M., Park S.H., Nam M.J. 2019. Effects of hepatocyte growth factor gene-transfected mesenchymal stem cells on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Growth Factors.* V. 37. P. 105.
<https://doi.org/10.1080/08977194.2019.1652399>
- Moskalev A., Chernyagina E., de Magalhães J.P., Barardo D., Thoppil H., Shaposhnikov M., Budovsky A., Fraifeld V.E., Garazha A., Tsvetkov V., Bronovitsky E., Bogomolov V., Scerbacov A., Kuryan O., Gurinovich R. et al. 2015. Geroprotectors.org: A new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease. *Aging (Albany NY).* V. 7. P. 616.
<https://doi.org/10.18632/aging.100799>
- Mu K., Zhang J., Gu Y., Li H., Han Y., Cheng N., Feng X., Ding G., Zhang R., Zhao Y., Wang H. 2018. Cord-derived mesenchymal stem cells therapy for liver cirrhosis in children with refractory Henoch-Schonlein purpura: A case report. *Medicine (Baltimore).* V. 97. e13287.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013287>
- Munro A., Corsi D.J., Martin L., Halpenny M., Dibdin N., Elmoazzen H.E., Walker M., Allan D.S. 2019. Obstetrical and neonatal factors associated with optimal public banking of umbilical cord blood in the context of delayed cord clamping. *Clin. Invest. Med.* V. 42. E56.
<https://doi.org/10.25011/cim.v42i3.33093>
- Musiak-Wysocka A., Kot M., Sułkowski M., Badyra B., Majka M. 2019. Molecular and functional verification of wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) pluripotency. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 1807.
<https://doi.org/10.3390/ijms20081807>
- Myers J.A., Miller J.S. 2020. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* V. 18. P. 85.
<https://doi.org/10.1038/s41571-020-0426-7>
- Nagano N., Saito M., Sugiura T., Miyahara F., Namba F., Ota E. 2018. Benefits of umbilical cord milking versus delayed cord clamping on neonatal outcomes in preterm infants: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* V. 13(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201528>
- Ni J., Liu X., Yin Y., Zhang P., Xu Y.W., Liu Z. 2019. Exosomes derived from TIMP2-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance the repair effect in rat model with myocardial infarction possibly by the Akt/Sfrp2 Pathway. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2019. P. 1958941.
<https://doi.org/10.1155/2019/1958941>
- Ochi T., Onishi Y., Nasu K., Onodera K., Kobayashi M., Ichikawa S., Fujiwara T., Fukuhara N., Yamada-Fujiwara M., Harigae H. 2019. Umbilical cord blood transplantation using reduced-intensity conditioning without antithymocyte globulin in adult patients with severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* V. 25. e55.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.09.039>
- Okur S.Ç., Erdoğan S., Demir C.S., Günel G., Karaöz E. 2018. The Effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation in a patient with cerebral palsy: A case report. *Int. J. Stem Cells.* V. 11. P. 141.
<https://doi.org/10.15283/ijsc17077>
- Orlando N., Pellegrino C., Valentini C.G., Bianchi M., Barbagallo O., Sparnacci S., Forni F., Fontana T.M., Teofili L. 2020. Umbilical cord blood: Current uses for transfusion and regenerative medicine. *Transfus. Apher. Sci.* V. 59. P. 102952.
<https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102952>
- Pan X.-H., Zhu L., Yao X., Liu J.-F., Li Z.-A., Yang J.-Y., Pang R.-Q., Ruan G.-P. 2016. Development of a tree shrew metabolic syndrome model and use of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for treatment. *Cyto-technol.* V. 68. P. 2449.
<https://doi.org/10.1007/s10616-016-9966-1>
- Park J.H., Hwang I., Hwang S.H., Han H., Ha H. 2012. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells prevent diabetic renal injury through paracrine action. *Diabetes Res. Clin. Pract.* V. 98. P. 465.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.09.034>
- Paul M., Dayal D., Bhansali A., Dhaliwal L., Sachdeva N. 2018. In vitro assessment of cord blood-derived proinsulin-specific regulatory T cells for cellular therapy in type 1 diabetes. *Cytotherapy.* V. 20. P. 1355.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.09.004>
- Peng Y., Chen B., Zhao J., Peng Z., Xu W., Yu G. 2019. Effect of intravenous transplantation of hUCB-MSCs on M1/M2 subtype conversion in monocyte/macrophages of AMI mice. *Biomed. Pharmacother.* V. 111. P. 624.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.095>
- Pereira T., Ivanova G., Caseiro A.R., Barbosa P., Bártoło P.J., Santos J.D., Luís A.L., Maurício A.C. 2014. MSCs conditioned media and umbilical cord blood plasma metabolo-

- mics and composition PLoS One. V. 9. e113769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113769>
- Pour M.S.S., Vahidi R., Lashkari M., Derakhshani A., Ameri Z., Farsinejad A.* 2020. Cord blood serum harvesting by hydroxyethyl starch: A fetal bovine serum alternative in expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnol.* V. 72. P. 551. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00404-9>
- Qi X., Guo X., Su C.* 2015. Clinical outcomes of the transplantation of stem cells from various human tissue sources in the management of liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* V. 10. P. 166. <https://doi.org/10.2174/1574888x09666141112114011>
- Rabe H., Gyte G.M., Díaz-Rossello J.L., Duley L.* 2019. Effect of timing of umbilical cord clamping and other strategies to influence placental transfusion at preterm birth on maternal and infant outcomes. *Cochrane Database Syst. Rev.* V. 9. P. CD003248. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003248.pub4>
- Rafieemehr H., Kheirandish M., Soleimani M.* 2015. Improving the neuronal differentiation efficiency of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultivated under appropriate conditions. *Iran. J. Basic Med. Sci.* V. 18. P. 1100. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26949497/>
- Rah W.J., Lee Y.H., Moon J.H., Jun H.J., Kang H.R., Koh H., Eom H.J., Lee J.Y., Lee Y.J., Kim J.Y., Choi Y.Y., Park K., Kim M.J., Kim S.H.* 2017. Neuroregenerative potential of intravenous G-CSF and autologous peripheral blood stem cells in children with cerebral palsy: a randomized, double-blind, cross-over study. *J. Transl. Med.* V. 15. P. 16. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1120-0>
- Reddi A.S., Kothari N., Kuppasani K., Ende N.* 2015. Human umbilical cord blood cells and diabetes mellitus: recent advances. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* V. 10. P. 266. <https://doi.org/10.2174/1574888x10666141212122421>
- Ren S., Hu J., Chen Y., Yuan T., Hu H., Li S.* 2016. Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells promote interleukin-17 production from human peripheral blood mononuclear cells of healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Exp. Immunol.* V. 183. P. 389. <https://doi.org/10.1111/cei.12737>
- Romanov Y.A., Vtorushina V.V., Dugina T.N., Romanov A.Y., Petrova N.V.* 2019. Human umbilical cord blood serum/plasma: Cytokine profile and prospective application in regenerative medicine. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 168. P. 173. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04670-2>
- Roo J.J.D., Staal F.J.T.* 2020. Cell signaling pathway reporters in adult. *Hematopoietic Stem Cells.* V. 9. P. 2264. <https://doi.org/10.3390/cells9102264>
- Rudnicki J., Kawa M.P., Kotowski M., Michalczyk B., Usitianowski P., Czajka R., Machaliński B.* 2015. Clinical evaluation of the safety and feasibility of whole autologous cord blood transplant as a source of stem and progenitor cells for extremely premature neonates: Preliminary report. *Exp. Clin. Transplant.* V. 13. P. 563. <https://doi.org/10.6002/ect.2015.0081>
- Ruggeri A., Paviglianiti A., Gluckman E., Rocha V.* 2016. Impact of HLA in cord blood transplantation outcomes. *HLA.* V. 87. P. 413. <https://doi.org/10.1111/tan.12792>
- Saito-Benz M., Flanagan P., Berry M.J.* 2020. Management of anaemia in pre-term infants. *Br. J. Haematol.* V. 188. P. 354. <https://doi.org/10.1111/bjh.16233>
- Saito-Benz M., Flanagan P., Berry M.J.* 2020. Management of anaemia in pre-term infants. *Br. J. Haematol.* V. 188. P. 354. <https://doi.org/10.1111/bjh.16233>
- Sakurai Y., Sarashina T., Toriumi N., Hatakeyama N., Kanayama T., Imamura T., Osumi T., Ohki K., Kiyokawa N., Azuma H.* 2021. B-Cell precursor-acute lymphoblastic leukemia with EBF1-PDGFRB fusion treated with hematopoietic stem cell transplantation and imatinib: A case report and literature review. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* V. 43. P. e105. <https://doi.org/10.1097/mp.0000000000001743>
- Sarin K., Chauhan S., Bisoi AK, Hazarika A, Malhotra N, Manek P.* 2018. Use of autologous umbilical cord blood transfusion in neonates undergoing surgical correction of congenital cardiac defects: A pilot study. *Ann. Card. Anaesth.* V. 21. P. 270. https://doi.org/10.4103/aca.ACA_194_17
- Sha S.J., Deutsch G.K., Tian L., Richardson K., Coburn M., Gaudio J.L., Marcal T., Solomon E., Boumis A., Bet A., Mennes M., van Oort E., Beckmann C.F., Braithwaite S.P., Jackson S. et al.* 2019. Safety, tolerability, and feasibility of young plasma infusion in the plasma for alzheimer symptom amelioration study: A randomized clinical trial. *JAMA Neurol.* V. 76. P. 35. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.3288>
- Shah F., Dwivedi M.* 2020. Pathophysiology and recent therapeutic insights of sickle cell disease. *Ann. Hematol.* V. 99. P. 925. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03977-9>
- Shamriz O., Chandrakasan S.* 2019. Update on advances in hematopoietic cell transplantation for primary immunodeficiency disorders. *Immunol. Allergy Clin. North. Am.* V. 39. P. 113. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.08.003>
- Sharma N., Goel M., Velpandian T., Titiyal J.S., Tandon R., Vajpayee R.B.* 2011. Evaluation of umbilical cord serum therapy in acute ocular chemical burns. *invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 52. P. 1087. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4170>
- Shin T.-H., Kim H.-S., Kang T.-W., Lee B.-C., Lee H.-Y., Kim Y.-J., Shin J.-H., Seo Y., Choi S.W., Lee S., Shin K., Seo K.-W., Kang K.-S.* 2016. Human umbilical cord blood-stem cells direct macrophage polarization and block inflammasome activation to alleviate rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis.* V. 7. e2524. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.442>
- Sjövall D., Staffas A.* 2020. The origin of leukemia: Genetic alterations and inflammatory factors in the development of premalignant clonal hematopoiesis. *Semin. Hematol.* V. 57. P. 7. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2020.05.003>
- Soni N.G., Jeng B.H.* 2016. Blood-derived topical therapy for ocular surface diseases. *Br. J. Ophthalmol.* V. 100. P. 22. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2015-306842>
- Soni S.* 2020. Gene therapies for transfusion dependent β -thalassaemia: Current status and critical criteria for success. *Am. J. Hematol.* V. 95. P. 1099. <https://doi.org/10.1002/ajh.25909>

- Stiner R., Alexander M., Liu G., Liao W., Liu Y., Yu J., Pone E.J., Zhao W., Lakey J.R.T.* 2019. Transplantation of stem cells from umbilical cord blood as therapy for type 1 diabetes. *Cell Tissue Res.* V. 378. P. 155.
<https://doi.org/10.1007/s00441-019-03046-2>
- Su Q., Kumar V., Sud N., Mahato R.I.* 2018. MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* V. 129. P. 54.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.01.009>
- Sun Y., Kong W., Huang S., Shi B., Zhang H., Chen W., Zhang H., Zhao C., Tang X., Yao G., Feng X., Sun L.* 2017. Comparable therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in collagen-induced arthritis to TNF inhibitor or anti-CD20 treatment. *Clin. Exp. Rheumatol.* V. 35. P. 288.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28094754/>
- Sun Y., Shi H., Yin S., Ji C., Zhang X., Zhang B., Wu P., Shi Y., Mao F., Yan Y., Xu W., Qian H.* 2018. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction. *ACS Nano.* V. 12. P. 7613.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07643>
- Surugiu R., Olaru A., Hermann D.M., Glavan D., Catalin B., Popa-Wagner A.* 2019. Recent advances in mono- and combined stem cell therapies of stroke in animal models and humans. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 6029.
<https://doi.org/10.3390/ijms20236029>
- Swierczek S., Prchal J.T.* 2020. Clonal hematopoiesis in hematological disorders: Three different scenarios. *Exp. Hematol.* V. 83. P. 57.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.01.013>
- Tai-MacArthur S., Lombardi G., Shangaris P.* 2020. The theoretical basis of in utero hematopoietic stem cell transplantation and its use in the treatment of blood disorders. *Stem Cells Dev.* V. 30. P. 49.
<https://doi.org/10.1089/scd.2020.0181>
- Tao H., Li Y., Wang T., Zhou C.* 2018. Umbilical cord blood stem cells transplantation as an adjunctive treatment strategy for liver cirrhosis in Chinese population: a meta-analysis of effectiveness and safety. *Ther. Clin. Risk Manag.* V. 14. P. 417.
<https://doi.org/10.2147/TCRM.S157603>
- Teng X., Chen L., Chen W., Yang J., Yang Z., Shen Z.* 2015. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation. *Cell Physiol. Biochem.* V. 37. P. 2415.
<https://doi.org/10.1159/000438594>
- Terashvili M., Bosnjak Z.J.* 2019. Stem cell therapies in cardiovascular disease. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* V. 33. P. 209.
<https://doi.org/10.1053/j.jvca.2018.04.048>
- Theil A., Wilhelm C., Guhr E., Reinhardt J., Bonifacio E.* 2015. The relative merits of cord blood as a cell source for autologous T regulatory cell therapy in type 1 diabetes. *Horm. Metab. Res.* V. 47. P. 48.
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1394372>
- Tuysuz G., Guler E., Ozel D., Kupesiz A.* 2019. Results of allogenic hematopoietic stem cell transplantation in fanconi anemia caused by bone marrow failure: single-regimen, single-center experience of 14 years. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 25. P. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.05.039>
- Ulyanova O., Baigenzhin A., Doskaliyev Z., Karibekov T., Kozina L., Saparbayev S., Trimova R.* 2018. Transforming growth factor β 1 in patients with type 2 diabetes mellitus after fetal pancreatic stem cell transplant. *Exp. Clin. Transplant.* V. 16. P. 168.
<https://doi.org/10.6002/ect.tond-tddt2017.p49>
- Vaillant A.A.J., Qurie A.* 2020. Immunodeficiency. Treasure Island (FL): StatPearls publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500027/>
- Vankeshwaram V., Maheshwary A., Mohite D., Omole J.A., Khan S.* 2020. Is stem cell therapy the new savior for cerebral palsy patients? A Review. *Cureus.* V. 12. e10214.
<https://doi.org/10.7759/cureus.10214>
- Venkat P., Shen Y., Chopp M., Chen J.* 2018. Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke. *Neuropharmacology.* V. 134. P. 310.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.036>
- Wang D., Niu L., Feng X., Yuan X., Zhao S., Zhang H., Liang J., Zhao C., Wang H., Hua B., Sun L.* 2017. Long-term safety of umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation for systemic lupus erythematosus: a 6-year follow-up study. *Clin. Exp. Med.* V. 17. P. 333.
<https://doi.org/10.1007/s10238-016-0427-0>
- Wang X.L., Zhao Y.Y., Sun L., Shi Y., Li Z.Q., Zhao X.D., Xu C.G., Ji H.G., Wang M., Xu W.R., Zhu W.* 2018. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve myocardial repair via upregulation of Smad7. *Int. J. Mol. Med.* V. 41. P. 3063.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3496>
- Wang Z., He D., Zeng Y.Y., Zhu L., Yang C., Lu Y.J., Huang J.Q., Cheng X.Y., Huang X.H., Tan X.J.* 2019. The spleen may be an important target of stem cell therapy for stroke. *J. Neuroinflamm.* V. 16. P. 20.
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1400-0>
- Wu J.Y., Lu Y., Chen J.S., Wu S.Q., Tang X.W., Li Y.* 2015. Pooled umbilical cord blood plasma for culturing UCMSC and ex vivo expanding umbilical cord blood CD34⁺ cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* V. 23. P. 1112.
<https://doi.org/10.7534/j.issn.1009-2137.2015.04.040>
- Xue E., Milano F.* 2020. Are we underutilizing bone marrow and cord blood? Review of their role and potential in the era of cellular therapies. *F1000Res.* F1000.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.20605.1>
- Yeng C.H., Chen P.J., Chang H.K., Lo W.Y., Wu C.C., Chang C.Y., Chou C.H., Chen S.H.* 2016. Attenuating spinal cord injury by conditioned medium from human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells in rats. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* V. 55. P. 85.
<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2015.12.009>
- Yokota T.* 2020. Processes regulating early lymphocyte differentiation. *Rinsho Ketsueki.* V. 61. P. 1048.
<https://doi.org/10.11406/rinketsu.61.1048>
- Yoo J., Kim H.-S., Seo J.-J., Eom J.-H., Choi S.-M., Park S., Kim D.-W., Hwang D.-Y.* 2016. Therapeutic effects of umbilical cord blood plasma in a rat model of acute ischemic stroke. *Oncotarget.* V. 7. P. 79131.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12998>
- Yoon K.C.* 2014. Use of umbilical cord serum in ophthalmology. *Chonnam. Med. J.* V. 50. P. 82.
<https://doi.org/10.4068/cmj.2014.50.3.82>
- Yu Y., Yoon K.-A., Kang T.-W., Jeon H.-J., Sim Y.-B., Choe S.H., Baek S.Y., Lee S., Seo K.-W., Kang K.-S.* 2019. Therapeutic

- effect of long-interval repeated intravenous administration of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* V. 13. P. 1134. <https://doi.org/10.1002/term.2861>
- Yuan X., Qin X., Wang D., Zhang Z., Tang X., Gao X., Chen W., Sun L. 2019. Mesenchymal stem cell therapy induces FLT3L and CD1c⁺ dendritic cells in systemic lupus erythematosus patients. *Nat. Commun.* V. 10. P. 2498. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10491-8>
- Yun H.D., Varma A., Hussain M.J., Nathan S., Brunstein C. 2019. Clinical relevance of immunobiology in umbilical cord blood transplantation. *J Clin. Med.* V. 8. P. 1968. <https://doi.org/10.3390/jcm8111968>
- Zhang G.Z., Sun H.C., Zheng L.B., Guo J.B., Zhang X.L. 2017. In vivo hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* V. 23. P. 8152. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i46.8152>
- Zhang H., Chen J., Que W. 2012. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in acute leukemia patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 18. P. 1164. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i46.8152>
- Zhang Q.Y., Dong F., Ema H. 2020. Research advance on in vitro generation of human hematopoietic stem cells for transplantation—review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* V. 28. P. 320. <https://doi.org/10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2020.01.053>
- Zhao L., Cheng G., Choksi K., Samanta A., Girgis M., Soder R., Vincent R.J., Wulser M., De Ruyter M., McEnulty P., Hauptman J., Yang Y., Weiner C.P., Dawn B. 2019. Transplantation of human umbilical cord blood-derived cellular fraction improves left ventricular function and remodeling after myocardial ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* V. 125. P. 759. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315216>

The Use of Umbilical Cord Blood and Its Components in Clinical Practice

A. G. Goncharov^a, K. A. Yurova^a, V. V. Shupletsova^a, N. D. Gazatova^a,
O. B. Melashchenko^a, and L. S. Litvinova^{a,*}

^a *Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236001 Russia*

**e-mail: larisalitvinova@yandex.ru*

The article provides a brief description of the components of umbilical cord blood (UCB). Variants of the use of UCB and its components, in particular, mesenchymal stem cells, in experimental biology and medicine, to activate the regeneration of organs and tissues, as part of complex measures for the treatment of chronic diseases of various origins (blood diseases and primary immunodeficiencies, neurodegenerative diseases, myocardial infarction, obesity, diabetes mellitus, liver cirrhosis, immune-dependent and autoimmune pathologies, etc.). The review also presents cases of the use of serum (plasma) UCB in postoperative recovery, for the treatment of eye and neurodegenerative diseases, in the treatment of age-related changes. The possibility of using serum/plasma UCB in the enrichment of culture media for the growth of various cell cultures used in regenerative medicine is described. The importance and necessity of standardization of methods for obtaining UCB and its components, their testing and routes of administration, as well as regulating the use of UCB and its components in clinical practice is emphasized. Particular attention in the review is paid to the use of UCB and its components in experimental biology for modeling the processes of reparation and regeneration of organs and tissues in model animals.

Keywords: umbilical cord blood, mesenchymal stem cells obtained from human PC, plasma, serum, erythrocyte mass

УДК 576.3/.53/.7

КОРРЕКЦИЯ ПОСТИШЕМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С ПОМОЩЬЮ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. И. Б. Соколова¹ *, О. П. Горшкова¹, Н. Н. Павличенко²

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²ООО “Транс-Технологии”, Санкт-Петербург, 192148 Россия

*E-mail: SokolovaIB@infran.ru

Поступила в редакцию 28.05.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принята к публикации 01.07.2021 г.

Цель исследования – выяснить, как влияет внутривенная трансплантация мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч), проведенная в день ишемии/реперфузии, на плотность сосудистой сети, реактивность пиальных артерий и тканевую перфузию в коре головного мозга через 7, 14 и 21 сут после ишемического воздействия. С помощью установки для изучения микроциркуляции исследовали плотность всей микрососудистой сети и плотность артериальных сосудов в пиальной оболочке сенсомоторной коры крыс, перенесших ишемию/реперфузию (И/Р) головного мозга, после внутривенной трансплантации МСКч. На этой же установке исследовали реактивность пиальных артерий на воздействие ацетилхолина (ACh). Параллельно с помощью лазерного доплерографа ЛАКК-М в сенсомоторной коре измеряли показатель перфузии (П). Наиболее значительно плотность всей микрососудистой сети и плотность артериальных сосудов понизились по сравнению с ложнооперированными (ЛО) крысами в первые 7 сут после И/Р: в среднем в 1.6 и 1.4 раз соответственно. Через 14 сут эти показатели составляли 1.4 и 1.2 раза, а через 21 сут – 1.2 и 1.3 раза. У животных, перенесших И/Р, значительно ухудшалась реактивность пиальных артерий на ACh. Через 7 сут после И/Р количество дилатирующих артерий понизилось в 1.4–1.7 раза, через 14 сут – в 1.6–1.9 раза, через 21 сут – в 1.2–1.7 раза. При этом через 21 сут статистически значимо снижались уровень П в среднем в 1.6 раза. Внутривенное введение МСКч привело к сохранению плотности микрососудистой сети пиальной оболочки у крыс на всех сроках после И/Р на уровне контрольных животных. Реактивность в группе клеточной терапии также не отличалась от контрольных значений. Уровень П через 21 сут после И/Р был ниже, чем в ЛО группе в 1.2 раза, но статистически значимо выше, чем у крыс с ишемическим повреждением головного мозга без введения МСКч. Заключение: внутривенная трансплантация МСКч позволила предотвратить деградацию микрососудистого русла в коре головного мозга крыс после И/Р и сохранить реактивность пиальных артерий на уровне контрольных животных.

Ключевые слова: ишемия/реперфузия, головной мозг, внутривенная трансплантация, мезенхимные стволовые клетки, плотность микрососудистого русла, реактивность, перфузия

DOI: 10.31857/S0041377121050114

Нарушение мозгового кровообращения вследствие образования тромба или длительного спазмирования церебральных артерий – одно из наиболее распространенных патологических состояний в современной повседневной жизни (Шляхто и др., 2012). Примерно в 30% случаев развитию инсульта предшествуют кратковременные преходящие нарушения мозгового кровообращения, не приводящие к развитию инфаркта, так называемые транзитор-

ные ишемические атаки (ТИА). Одним из основных факторов, определяющих исход и отдаленные последствия ТИА, является состояние мозговой гемодинамики – степень ее нарушения и выраженность компенсаторных механизмов. Возникновение повторных ишемических поражений головного мозга во многом связывают с формированием микро- и макроангиопатий, приводящих к развитию гемодинамических нарушений, в основе которых лежит эндотелиальная дисфункция (ЭД). К настоящему времени доказано, что эндотелиальные клетки принимают участие во многих процессах регуляции гемостаза и микроциркуляции (Манухина, Малышев, 2003; Gimbrone, Garcia-Cardena, 2016). Развитие ЭД приводит к дисбалансу выработки веществ,

Принятые сокращения: АД – артериальное давление; ЛО – ложнооперированные крысы; МСК и МСКч – мезенхимные стволовые клетки и МСК человека соответственно; П – показатель перфузии; И/Р – ишемия/реперфузия; ТИА – транзиторные ишемические атаки; ЭД – эндотелиальная дисфункция; ACh – ацетилхолин.

вызывающих вазодилатацию и вазоконстрикцию, усиливаются пролиферация гладкомышечных клеток, процессы адгезии и тромбообразования. Стенки мозговых артерий теряют эластичность, утолщаются, уменьшается сосудистый просвет, что может вызывать ухудшение снабжения ткани головного мозга кислородом.

Разработка способов восстановления мозговой микроциркуляции и функций эндотелия церебральных сосудов при различных патологиях – актуальная задача современной медицины и биологии. Применение с этой целью мезенхимных стволовых клеток (МСК) является инновационным и очень перспективным подходом. В многочисленных работах за последние 30 лет показано, что трансплантация МСК после ишемических или травматических повреждений головного мозга приводит к уменьшению объема поврежденной ткани, сохранению функции нейронов в пограничной с повреждением зоне, восстановлению микроциркуляции (Feng et al., 2016; Fitzsimmons et al., 2018). Применение МСК для восстановления функции эндотелия церебральных сосудов после ТИА – практически не исследованный путь коррекции постишемических осложнений. К настоящему времени в работах *in vitro* и *in vivo* доказано, что МСК способны модулировать воспалительные (Newman et al., 2009), иммунные процессы и окислительный стресс (Calio et al., 2014), особенно в условиях ишемии. В отдельных работах показано, что МСК могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки (Pu et al., 2016) и оказывать протекторное воздействие на эндотелиальные клетки церебральных сосудов после ишемического инсульта (Chung et al., 2015; Liu et al., 2019).

Цель исследования – выяснить, как влияет внутривенная трансплантация МСКч, проведенная в день ишемии/реперфузии, на плотность сосудистой сети, реактивность пиальных артерий и тканевую перфузию в коре головного мозга через 7, 14 и 21 сут после ишемического воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на животных из биокolleкции “Colleкция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России. Исследования проводили в соответствии с регламентом, установленным МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 (“Правила лабораторной практики”), Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, и рекомендациями биоэтической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Животные. Эксперименты проведены на крысах-самцах Wistar ($n = 85$). Животных содержали в стан-

дартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

Ишемия/реперфузия. У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс ишемию воспроизводили с использованием техники 12-минутной окклюзии обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45 ± 3 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). Прямое измерение АД производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разработанной в нашей лаборатории. По окончании периода ишемии производили полную реинфузию забранной крови. После ушивания операционных ран и выхода из наркоза (на подогреваемых столиках) животных возвращали в клетки обычного содержания.

МСКч и их трансплантация. Для внутривенной трансплантации использовали мезенхимные стволовые клетки человека (МСКч), полученные от одного донора. Выделение МСК из костного мозга, их культивирование и фенотипирование проводили в ООО “Транс-Технологии” по стандартным, общепринятым методикам с минимальными изменениями (Azizi et al., 1998; Penforinis, Pochampally, 2011). В частности, для культивирования МСКч использовали питательную среду α -MEM (Nuclone, Новая Зеландия), с добавлением 20% сыворотки крови эмбрионов коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Фенотипирование МСКч проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSScan (Beckton Dickinson, США). МСКч окрашивали с помощью антител против позитивных маркеров CD90, CD105, CD44, CD73 и антител против негативных маркеров CD45, CD34, CD14, CD11b, HLA-DR и 7AAD (Beckton Dickinson, США). Для трансплантации использовали МСКч на 2–3 пассажах. Внутривенная трансплантация была проведена крысам через 1 ч после И/Р головного мозга. Каждому животному было введено 5 млн МСКч в 30 мкл культуральной среде.

Все последующие хирургические и экспериментальные действия были проведены на наркотизированных внутрибрюшинно (золетил (20 мг/кг) (Virbas, Франция) крысах; этаназия проведена путем введения увеличенной дозы золетила.

Группы животных. 1. Контрольная группа: ложнооперированные (ЛО) крысы Вистар, которые подвергались оперативному вмешательству, но без проведения И/Р. Исследования плотности сосудистой сети, реактивности пиальных артерий и перфузии в сенсомоторной коре у данной и всех последующих групп на отдельных подгруппах животных (острые

опыты) были проведены через 7, 14, 21 сут после хирургического воздействия. Вес крыс и АД на 7 сут ($n = 9$) составляли 245 ± 13.8 г и 139 ± 5.6 мм рт. ст. соответственно, на 14 сут ($n = 10$) – 303 ± 12.7 г и 133 ± 4.6 мм рт. ст. соответственно, на 21 сут ($n = 9$) – 330 ± 12.2 г и 135 ± 2 мм рт. ст. соответственно.

2. Крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга. Вес и АД на 7 сут ($n = 9$) составляли 259 ± 12.1 г и 149 ± 4.7 мм рт. ст. соответственно, на 14 сут ($n = 8$) – 256 ± 5.2 г и 133 ± 5.3 мм рт. ст. соответственно и на 21 сут ($n = 9$) – 318 ± 4.2 г и 124 ± 3.9 мм рт. ст. соответственно.

3. Крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга и внутривенно введены МСКч. Вес и АД на 7 сут ($n = 9$) составляли 250 ± 11.3 г и 144 ± 4.1 мм рт. ст. соответственно, на 14 сут ($n = 10$) – 306 ± 9.9 г и 134 ± 4.9 мм рт. ст. соответственно и на 21 сут ($n = 12$) – 327 ± 6.3 г и 123 ± 5.7 мм рт. ст. соответственно.

Визуализация и мониторинг микрососудистой сети.

Для проведения прижизненного исследования реакций пиальных артерий в теменной области черепа животного высверливали отверстие ($S \approx 1$ см²). Твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (рН 7.4), температура которого составляла 37°C. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне и составляли 134 ± 5 мм рт. ст. Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 38°C. Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (Микромед, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scorpetek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии Photo M (авторская разработка А. Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru) определяли количество артерий и общее количество микрососудов на определенной площади. Затем измеряли диаметры пиальных артериальных сосудов. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано более 40 пиальных артерий. Диаметр артерий фиксировали в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса и при орошении мозга раствором ацетилхолина (ACh) (10^{-7} М/л) (Sigma-Aldrich, USA). Экспериментально показано, что пиальные микрососуды разного диаметра реагируют на воздействие ACh не одинаково: чем меньше исходный диаметр, тем больше реакция (Горшкова и др., 2016). В связи с этим мы также разбили все исследованные пиальные артериальные микрососуды на группы: более 40 мкм, 20–40 мкм, менее 20 мкм. О результатах воз-

действия ACh судили по количеству расширившихся артериальных сосудов и по степени их расширения.

У тех же экспериментальных животных с помощью многофункционального лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М (ЛАЗМА, Россия) измеряли перфузию (П) в ткани коры головного мозга. Датчик прибора размещали в 3х точках над сенсомоторной корой с приблизительными координатами AP = 1, 2, 3 мм от брегмы; SD = 1.0 мм латерально от сагиттального шва. Прилагаемое к комплексу ЛАКК-М программное обеспечение автоматически рассчитывало среднюю величину показателя микроциркуляции – П.

Статистическая оценка данных. Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариантов в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке, при распределении отличном от нормального, при сравнении групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ культуры МСКч методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла на 99.7% из CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺-клеток (собственно МСК), на 0.3% CD45⁺, CD34⁺-клеток (клетки гемопоэтического ряда) и на 0.5% из CD14⁺, CD11b⁺, HLA-DR⁺, 7AAD⁺-клеток (нежизнеспособных) было не более 0.9–1%.

Результаты исследования плотности микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры у ЛО и крыс, перенесших И/Р головного мозга, представлены на рис. 1. После И/Р у крыс плотность всей микрососудистой сети и плотность артериальных сосудов наиболее значительно понижались по сравнению с ЛО в первые 7 сут – в среднем в 1.6 и 1.4 раз соответственно. Через 14 сут плотность всей микрососудистой сети и плотность артериальных сосудов были ниже, чем в ЛО группе соответственно в 1.4 и 1.2 раза, а через 21 сут – в 1.2 и 1.3 раза. В группе животных, перенесших И/Р, которым была проведена внутривенная трансплантация МСКч, плотность микрососудистой сети пиальной оболочки сохранилась в полном объеме на уровне ЛО крыс в течение всего периода исследования.

В группе животных, перенесших И/Р головного мозга, мы выявили значительное ухудшение реак-

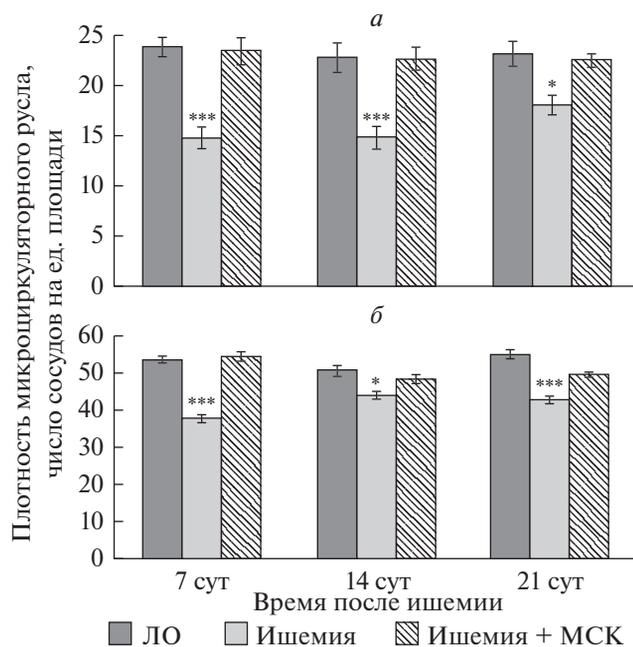


Рис. 1. Показатель плотности микрососудистого русла у ЛО и перенесших ишемию крыс. *а* – Плотность артериального участка микрососудистой сети тонуса, *б* – плотность всего исследованного участка сосудистой сети. Темная заливка – ЛО крысы; светлая заливка – крысы, перенесшие ишемию; штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым в день операции была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – время, прошедшее после ишемии; по вертикали – показатель плотности микрососудистого русла. Звездочками отмечены значимые изменения по сравнению с соответствующими значениями у ЛО животных данной группы (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна).

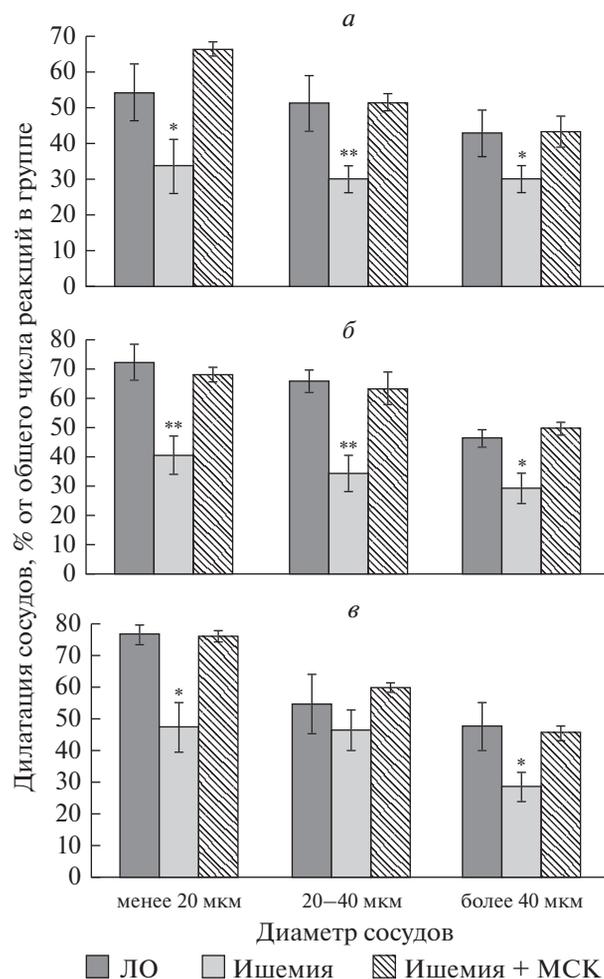


Рис. 2. Число пиальных артерий, ответивших дилатацией на воздействие ацетилхолина. *а* – 7 сут после ишемии, *б* – 14 сут после ишемии, *в* – 21 сут после ишемии. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие ишемию, штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым в день операции была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – диаметр сосудов, по вертикали – число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие АСh, % от общего числа реакций на АСh в группе. Звездочками отмечены значимые изменения по сравнению с соответствующими значениями у ЛО животных данной группы (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна).

тивности стенок пиальных артерий при аппликации на поверхность мозга АСh (рис. 2). У крыс из этой группы, число артериальных сосудов, ответивших расширением (увеличением диаметра) на воздействие АСh, через 7 сут понизилось в 1.4–1.7 раза, через 14 сут – в 1.6–1.9 раза, через 21 сут – в 1.2–1.7 раза по сравнению с ЛО крысами. По степени изменения диаметров (данные не показаны) не было выявлено различий между группами животных. Применение МСКч позволило сохранить реактивность пиальных артерий на уровне ЛО животных. Как видно из рис. 2, в группе клеточной терапии расширением на воздействие АСh ответило столько же артериальных микрососудов, сколько и в контрольной группе. Степень их расширения была такой же, как у ЛО животных.

Уровень П в ткани сенсомоторной коры через 7 и 14 сут у всех животных, перенесших И/Р головного мозга, оставался примерно таким же, как у ЛО крыс (рис. 3). На 21 сут после И/Р мы выявили значительное понижение П в среднем в 1.6 раза в группе крыс,

подвергнутых только И/Р. У животных из группы клеточной терапии на 21 сут после ишемии также было выявлено понижение П, но менее значимое (в среднем в 1.2 раза).

ОБСУЖДЕНИЕ

К нарушению функций нейрососудистой единицы при церебральной ишемии приводит как резкое понижение кровотока в ткани мозга, так и его восстановление (Bai, Lyden, 2015; Kalogeris et al., 2017).

Оптимальная терапевтическая стратегия при лечении последствий ишемии – минимизировать развитие таких патологических процессов, как воспаление, окислительный стресс, нарушение метаболизма, эндотелиальная дисфункция. Применение МСК позволяет купировать тканевое воспаление (Newman et al., 2009) и развитие окислительного стресса (Calio et al., 2014). МСК выделяют нейропротекторные вещества (Mahmood et al., 2004). В последние годы в зарубежной литературе появился ряд публикаций, доказывающих, что трансплантация МСК восстанавливает функцию эндотелия мозговых сосудов (Chung et al., 2015; Abumaree et al., 2017). Ранее на старых, спонтанно гипертензивных крысах и на животных, перенесших нефрэктомии, мы наблюдали восстановление плотности микрососудистого русла пиальной оболочки, функций эндотелия пиальных артерий и П в коре головного мозга в течение года после интрацеребральной или внутривенной трансплантации МСК (Соколова, Полынцев, 2017; Соколова, Павличенко, 2020). Такой же положительный эффект от внутривенной трансплантации МСК в день моделирования ишемического воздействия мы наблюдаем и в представленном исследовании. У крыс, перенесших И/Р через 7, 14 и 21 сут плотность всей микрососудистой сети пиальной оболочки снижалась в 1.4, 1.2, 1.3 раза соответственно; плотность артериального участка – в 1.6, 1.4 и 1.2 раза соответственно. После клеточной терапии у животных полностью сохранялась сосудистая сеть пиальной оболочки в течение всего периода наблюдений (рис. 1). Вероятно, в данном случае мы имеем дело именно с сохранением нативных сосудов (особенно в первые 7 сут), связанным с выделением МСК протекторных факторов. Наиболее значимо то, что с помощью МСК удалось не просто сохранить структуру микрососудистой сети, но и предотвратить развитие ЭД. Ишемическое воздействие резко негативно повлияло на состояние эндотелиальных клеток пиальных артерий (рис. 2): на воздействие ацетилхолина на 7, 14 и 21 сут после И/Р головного мозга расширением отреагировало в 1.2–1.9 раза меньше сосудов, чем у контрольных крыс. Ранее нами было показано, что через 7 дней после ишемии в периферической крови отмечается увеличение содержания циркулирующих эндотелиальных клеток, что может быть связано с усилением десквамации эндотелиальных клеток в результате повреждения эндотелия (Горшкова и др., 2016). Нарушение целостности эндотелиального слоя в этот отрезок постшемического периода может быть причиной наблюдающегося в дальнейшем ухудшения вазодилататорных эндотелий-зависимых сосудистых реакций на АСh. Следовательно, кратковременная ишемия приводит к развитию ЭД в пиальных артериальных сосудах и к 21 сут восстановления функции эндотелия не произошло. Применение МСК позволило полностью предотвратить развитие ЭД у ишемизированных животных в течение всего периода наблюдений (рис. 2). Эндотелиальные клет-

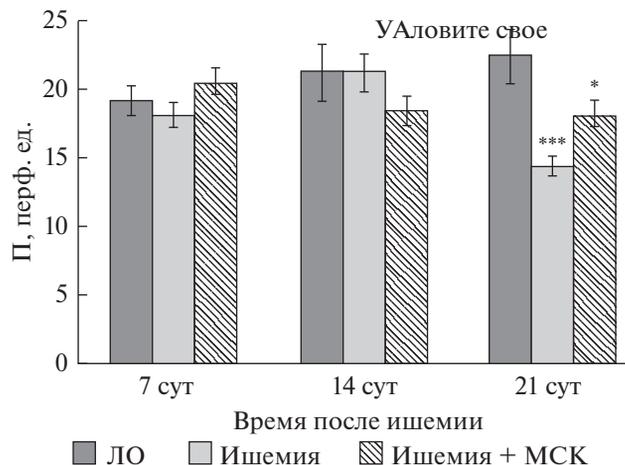


Рис. 3. Изменение показателя микроциркуляции головного мозга у ЛО и перенесших ишемию крыс. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие ишемию, штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым в день операции была проведена внутривенная трансплантация МСК. По горизонтали – время, прошедшее после ишемии; по вертикали – показатель перфузии. Звездочками отмечены значимые изменения по сравнению с соответствующими значениями у ЛО животных данной группы (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна).

ки секретируют ряд вазоактивных веществ, поддерживая гомеостаз сосудистой стенки и модулируя сосудистый ответ на эндогенные и экзогенные воздействия (Ierssel et al., 2015). Скорость тканевого кровотока регулируется расслаблением/сокращением гладкомышечных клеток в стенке артерий. Для адекватного обеспечения кислородом в ткани головного мозга должен поддерживаться определенный уровень скорости кровотока, интегральным показателем которого является измеряемая нами перфузия (П). Статистически значимое понижение П мы наблюдали у всех крыс, перенесших И/Р головного мозга только на 21 сут. В группе животных, которым была проведена только И/Р П понизилась примерно в 1.6 раза по сравнению с ЛО крысами. В группе клеточной терапии понижение П было менее выражено: в среднем в 1.2 раза ниже, чем у ЛО животных, но статистически значимо выше, чем у крыс, перенесших только И/Р. Показатель П прямо пропорционален скорости и количеству эритроцитов в зондируемом тканевом объеме (Крупаткин, Сидоров, 2013). Сохранение уровня П у крыс после И/Р головного мозга в первые 14 сут может быть связано с увеличением линейной скорости кровотока и/или с явлениями застоя крови в сосудах коры головного мозга. Возможные механизмы ухудшения П к 21 сут могут включать понижение плотности микрососудистой сети, сдавливание просвета сосудов набухшими отростками астроцитов, внутрисосудистое скопление эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов (Bai, Lyden, 2015).

Положительный эффект от клеточной терапии мы, как и другие исследователи (Kalogeris et al., 2017), связываем с паракринной функцией МСК.

Итак, внутривенная трансплантация МСКч после ишемии/реперфузии привела к сохранению структуры микрососудистой сети пиальной оболочки коры головного мозга и предотвратила развитие эндотелиальной дисфункции в пиальных артериях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47_110_ДРиОК).

Тема 64.1 (0134-2019-0001) “Раскрытие механизмов взаимодействия молекулярно-клеточных и системных регуляций функций внутренних органов”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на крысах проводили в соответствии с регламентом, установленным МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 (“Правила лабораторной практики”) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, и рекомендациями биоэтической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Горшкова О.П., Шуваева В.Н., Ленцман М.В., Артемьева А.И. 2016. Постишемические изменения вазомоторной функции эндотелия. Современные проблемы науки и образования. Т. 5. URL: <http://www.science-education.ru>. (Gorshkova O.P., Shuvaeva V.N., Lensman M.V., Artem'eva A.I. 2016. Post-ischemic changes in the vasomotor function of endothelium. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. V. 5.)

Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем (Руководство для врачей). 2013. М.: Либроком. (Krupatkin A.I., Sidorov V.V. *Functional diagnostics of state of microcirculatory-tissue systems (Guidelines for physicians)*. 2013. М.: Librocom.)

Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. 2003. Роль оксида азота в развитии и предупреждении дисфункции эндотелия. Вестник ВГМУ. Т. 2. № 2. С. 5. (Manukhina E.B., Malyshev I.Yu. 2003. The role of nitrogen oxide in the progression and prevention of endothelial dysfunction. *Vestnik VGMU*. V. 2. № 2. P. 5.)

Соколова И.Б., Павличенко Н.Н. 2020. Эффективность применения мезенхимных стволовых клеток для улучшения микроциркуляции в коре головного мозга нефрэктомизированных крыс. Цитология. Т. 62. № 6.

С. 410. (Sokolova I.B., Pavlichenko N.N. 2020. The efficacy of mesenchymal stem cells transplantation for improvement of microcirculation in the cerebral cortex of nephrectomized rats. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya)*. V. 62. № 6. P. 410.)

Соколова И.Б., Польшинцев Д.Г. 2017. Эффективность применения МСК для улучшения микроциркуляции в коре головного мозга спонтанно гипертензивных крыс. Цитология. Т. 59. № 4. С. 279. (Sokolova I.B., Polyntsev D.G. 2017. The efficacy of mesenchymal stem cells for the improvement of cerebral microcirculation in spontaneously hypertensive rats. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya)*. V. 59. № 4. P. 279.)

Шляхто Е.В., Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М. 2012. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1. Вестник РАМН. Т. 6. С. 42. (Shlyakhto E.V., Barantsevich E.R., Shcherbak N.S., Galagudza M.M. 2012. Molecular mechanisms of development of cerebral tolerance to ischemia. Part 1. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. V. 6. P. 42.)

Abumaree M., Hakami M., Abomaray F. 2017. Human chorionic villous mesenchymal stem/stromal cells modify the effects of oxidative stress on endothelial cell functions. *Placenta*. V. 59. P. 74.

Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J., DiGirolamo C., Prockop D.J. 1998. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 95. P. 3908.

Bai J., Lyden P. 2015. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: New insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *Int J Stroke*. V. 10. P. 143.

Calio M., Marinbo D., Ko G., Ribeiro R., Carbonel A., Oyama L., Ormanji M., Guirao T., Calio P., Reis L., Simoes M., Lisboa-Nascimento T., Ferreira A., Bertoincini C. 2014. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model. *Free Radical Biol. Med*. V. 70. P. 141.

Chung T., Kim J., Choi B. 2015. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduce neuronal death after transient global cerebral ischemia through prevention of blood-brain barrier disruption and endothelial damage. *Stem Cells Trans. Med*. V. 4. P. 178.

Feng N., Hao G., Yang F., Qu F., Zheng H., Liang S., Jin Y. 2016. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes the functional recovery of the central nervous system following cerebral ischemia by inhibiting myelin-associated inhibitor expression and neural apoptosis. *Exp. Therap. Med*. V. 11. P. 1595.

Fitzsimmons R., Mazurek M., Soos A., Simmons C. 2018. Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells Intern*. 2018: 8031718. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>

Gimbrone M., Garcia-Cardena G. 2016. Endothelial cell dysfunction and the pathology of atherosclerosis. *Circ. Res*. V. 118. P. 620.

- Ierssel S., Conraads V., Craenenbroeck E., Liu Y., Maas A., Parizel P., Hoymans V., Vrints C., Jorens P. 2015. Endothelial dysfunction in acute brain injury and the development of cerebral ischemia. *J Neurosci. Res.* V. 93. P. 866.
- Kalogeris T., Baines C., Krenz M., Korthuis R. 2016. Ischemia/Reperfusion. 2017. *Compr. Physiol.* V. 7. P. 113.
- Liu K., Guo L., Zhou Z., Pan M., Yan C. 2019. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc. Res.* V. 123. P. 74.
- Mahmood A., Lu D., Chopp M. 2004. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* V. 21. P. 33.
- Newman R., Yoo D., LeRoux M. 2009. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation and Allergy.* V. 8. P. 110.
- Penforis P., Pochampally R. 2011. Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow. *Methods Mol. Biol.* V. 698. P. 11.
- Pu C., Liu C., Liang C., Yen Y.-H., Chen S.-H., Jiang-Shieh Y.-F., Chien C.-L., Chen Y.-C., Chen Y.-L. 2016. Adipose-derived stem cells protect skin flaps against ischemia/reperfusion injury via IL-6 expression. *J. Investig. Dermatol.* V. 137. P. 1353.

Correction of Post-Ischemic Microcirculation Disturbances in the Rat Brain Cortex by Application of Mesenchymal Stem Cells

I. B. Sokolova^{a, *}, O. P. Gorshkova^a, and N. N. Pavlichenko^b

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia

^b Trans-Technologies, Ltd, St. Petersburg, 192148 Russia

*e-mail: SokolovaIB@infran.ru

The aim of the work was to examine the effect of intravenous transplantation of human mesenchymal stem cells (hMSC) carried out on the day of ischemia/reperfusion on the density of the microvascular network, reactivity of arterial vessels, and tissue perfusion in the cerebral cortex of rats on 7, 14 and 21 day after ischemia. Using an apparatus for studying microcirculation, the density of the entire microvascular network and the density of arterial vessels in the pial membrane of the sensorimotor cortex of the brain of rats after ischemia/reperfusion (I/R) and intravenous transplantation of hMSCs. The same device was used to study the reactivity of the pial arteries after exposure to the acetylcholine (ACh). In parallel, the perfusion (P) in the sensorimotor cortex was measured with a LAKK-M laser doppler. The most significant decrease in the density of the entire microvascular network and the density of arterial vessels compared to sham-operated rats were detected during the first 7 days after I/R; by an average of 1.6 and 1.4 times, respectively. Fourteen days after ischemia, these parameters were decreased by 1.4 and 1.2 times, and after 21 days – by 1.2 and 1.3 times, respectively. The reactivity of the pial arteries to ACh in animals after I/R significantly reduced. Seven days after I/R, the number of dilated arteries decreased by 1.4–1.7 times, 14 days after ischemia – by 1.6–1.9 times and after 21 days – by 1.2–1.7 times. The perfusion (P) decreased by an average of 1.6 times 21 days after ischemia. Intravenous administration of hMSC restored the density of the pial membrane microvascular network (at the level of control animals) in rats after ischemia. Reactivity of the arteries in the cell therapy group also did not differ from the control values. Twenty-one day after I/R P level was 1.2 times lower than in sham-operated group but statistically significantly higher than in rats after I/R that did not receive cell therapy. Conclusion: intravenous hMSCs transplantation prevented degradation of the microvascular bed in the cerebral cortex of rats after I/R and preserved the reactivity of pial arteries at the level of control animals.

Keywords: ischemia/reperfusion, brain, intravenous transplantation, mesenchymal stem cells, microvascular density, reactivity, perfusion

УДК 611.018.8:612.65

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ГАМК И $\alpha 1$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА В КЛЕТКАХ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА КРЫСЫ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

© 2021 г. Л. И. Хожай*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2021 г.

После доработки 15.06.2021 г.

Принята к публикации 21.06.2021 г.

Цель работы заключалась в выявлении иммуноцитохимическими методами ГАМК и $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК_A-рецептора в неонатальный период развития (5-е и 10-е сутки постнатального развития) у крыс. Показано, что в субвентрикулярной зоне (СВЗ) в неонатальный период, также как и в СВЗ взрослого мозга присутствуют все типы прогениторных клеток. Значительная часть прогениторных клеток (30%) дифференцируется по нейрональному типу и представляет собой мигрирующие юные нейробласты (тип А), количество которых остается постоянным на протяжении всего неонатального периода. Юные нейробласты и часть астроцитоподобных стволовых клеток иммуноположительны на ГАМК, число таких клеток составляет около 40% и сохраняется постоянным на протяжении всего неонатального периода. Подавляющее большинство клеток СВЗ – юные нейробласты (тип А), астроцитоподобные стволовые клетки (тип В) и часть транзиторных клеток (тип С) – экспрессируют ГАМК_A-рецептор, содержащий субъединицу $\alpha 1$. Количество этих типов прогениторных клеток поддерживается в течение неонатального периода на постоянном уровне. Присутствие ГАМК_A $\alpha 1$ -рецепторов в подавляющем числе клеток СВЗ указывает на возможное вовлечение ГАМК и ГАМКергической передачи сигналов в регуляцию функционирования разных типов клеток СВЗ.

Ключевые слова: субвентрикулярная зона, нейрональные стволовые клетки, ГАМК, ГАМК_A $\alpha 1$, неонатальный период

DOI: 10.31857/S0041377121050072

Известно, что у млекопитающих и человека в субвентрикулярной зоне (СВЗ) взрослого мозга, одной из нейрогенных ниш, продолжительный период времени сохраняется генерация нейральных клеток. СВЗ содержит самый большой пул стволовых нейральных клеток, которые дают начало новым популяциям нервных и нейроглиальных клеток (Anderson, 2001; Sanai et al., 2004; Conover, Notti, 2008; Platel et al., 2010). Область субвентрикулярной зоны содержит несколько основных типов клеток, различающихся по своей морфологии и экспрессирующим различные маркерные белки. Юные нейробласты (тип А), имеющие отростки, образуют цепочки клеток и мигрируют из СВЗ к другим формациям головного мозга. Крупные малодифференцированные стволовые клетки (тип В), экспрессирующие глиальный фибриллярный белок (GFAP) и рассматриваемые как астроцитоподобные клетки СВЗ, часто окружают цепочки мигрирующих нейробластов и обладают некоторыми свойствами астроцитов. Транзиторные клетки-предшественники (тип С) – мелкие, округлой формы, рассеянные по территории СВЗ, облада-

ющие высокой способностью к пролиферации – могут располагаться группами рядом с нейробластами или одиночно. Наконец, еще один тип – это эпендимные клетки, несущие реснички на апикальной поверхности, выстилающие полость латерального желудочка (Peretto et al., 1997; Doetsch et al., 1997; Mercier et al., 2002; Platel et al., 2010).

Юные нейробласты мигрируют вдоль рострального миграционного пути в обонятельную луковицу, также установлена их миграция в неокортекс и стрiatum (Kreuzberg et al., 2010), где они дифференцируются в интернейроны и интегрируются в локальные тормозные сети (Luskin, 1993; Swarzenski et al., 1996). Установлено, что в СВЗ взрослого мозга процесс образования новых клеток происходит постоянно и приблизительные подсчеты показали, что только к обонятельной луковице каждый день мигрирует от 10000 до 30000 нейробластов (Lledo et al., 2006). Такой активный нейрогенез требует гомеостатического контроля, баланса интенсивности пролиферации стволовых клеток и миграции дифференцирующихся клеток.

СВЗ во взрослом мозге содержит множество молекулярных факторов, которые могут осуществлять контроль как пролиферации стволовых нейральных

Принятые сокращения: СВЗ – субвентрикулярная зона; GAD – глутаматдекарбоксилаза.

клеток, так и миграции нейробластов (Hagg, 2005). Одним из таких факторов является тормозный нейротрансмиттер гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), который, как показано, может осуществлять контроль пролиферации нейральных клеток, а также играть критическую роль на разных этапах созревания нейронов в период становления неокортекса (Schlett, 2006; Platel et al., 2010). Показано, что основным рецептором, участвующим в быстрой синаптической трансмиссии ГАМК во взрослом мозге, является ГАМК_A-рецептор, содержащий $\alpha 1$ -субъединицу. Было показано, что в условиях культивирования нейробласты и клетки-предшественники других типов в СВЗ экспрессируют ГАМК_A-рецепторы, содержащие различные субъединицы и могут активироваться самой ГАМК, высвобождаемой в окружающую среду (Stewart et al., 2002). В настоящее время большинство работ по исследованию экспрессии ГАМК и ГАМК_A-рецептора в клетках СВЗ были проведены в условиях культуры клеток СВЗ взрослого мозга. Несмотря на большой интерес к механизмам самовосстановления численности популяций нейронов в зрелом мозге после повреждения, сопровождающегося утратой части нейронов, в настоящее время в литературе недостаточно данных об экспрессии ГАМК и ГАМК_A-рецептора, содержащего $\alpha 1$ -субъединицу в неонатальный период, когда имеет место развитие и становление как самого мозга, так и ГАМКергической тормозной системы.

В связи с этим целью работы являлось изучение экспрессии ГАМК и $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК_A-рецептора в СВЗ в неонатальный период развития у крыс и попытка оценки роли ГАМК в регуляции пролиферации прогениторных клеток СВЗ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург).

Гистологические и иммуногистохимические методы исследования. Головной мозг извлекали, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7.4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы –1.80–1.68 мм (Paxinos, Watson, 1998). Затем срезы помещали на предметные стекла Super-Frost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия). У интактных животных исследовали СВЗ (рис. 1а, область исследования – выделенный фрагмент), на 5-е ($n = 5$) и 10-е ($n = 5$) сутки постнатального развития (П5 и П10).

Иммуногистохимическую реакцию на β -III-тубулин проводили с использованием первичных кроличьих моноклональных антител (anti-beta-III-tubulin, клон [EP1569Y], Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 50. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 18 ч. В качестве

вторичных реагентов для антител к β -III-тубулину использовали реактивы из набора LSAB + System-HRP (Dako, Дания) (срезы помещали в биотинилированные антитела “Link” на 35 мин при комнатной температуре и после промывания в фосфатном буфере помещали в стрептовидин/HRP на 30 мин при комнатной температуре). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Иммуногистохимическую реакцию на ГАМК проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) (Abscam, Великобритания). Срезы помещали во вторичные антитела на 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Иммуногистохимическую реакцию на выявление $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК_A-рецептора осуществляли с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA_A $\alpha 1$ receptor antibody, Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 300. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 20 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных реагентов для антител к GABA_A $\alpha 1$ использовали реактивы из набора EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Инкубацию срезов во вторичных антителах осуществляли в течение 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в синтетическую заливочную среду Permaunt (Termo, США). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Статистическая обработка результатов исследования. При проведении иммуногистохимических реакций все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от обеих возрастных групп. Материал анализировали на цифровых изображениях фронтальных серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Количество иммуноположительных клеток оценивали на стандартной площади 0.1 мм² (условной

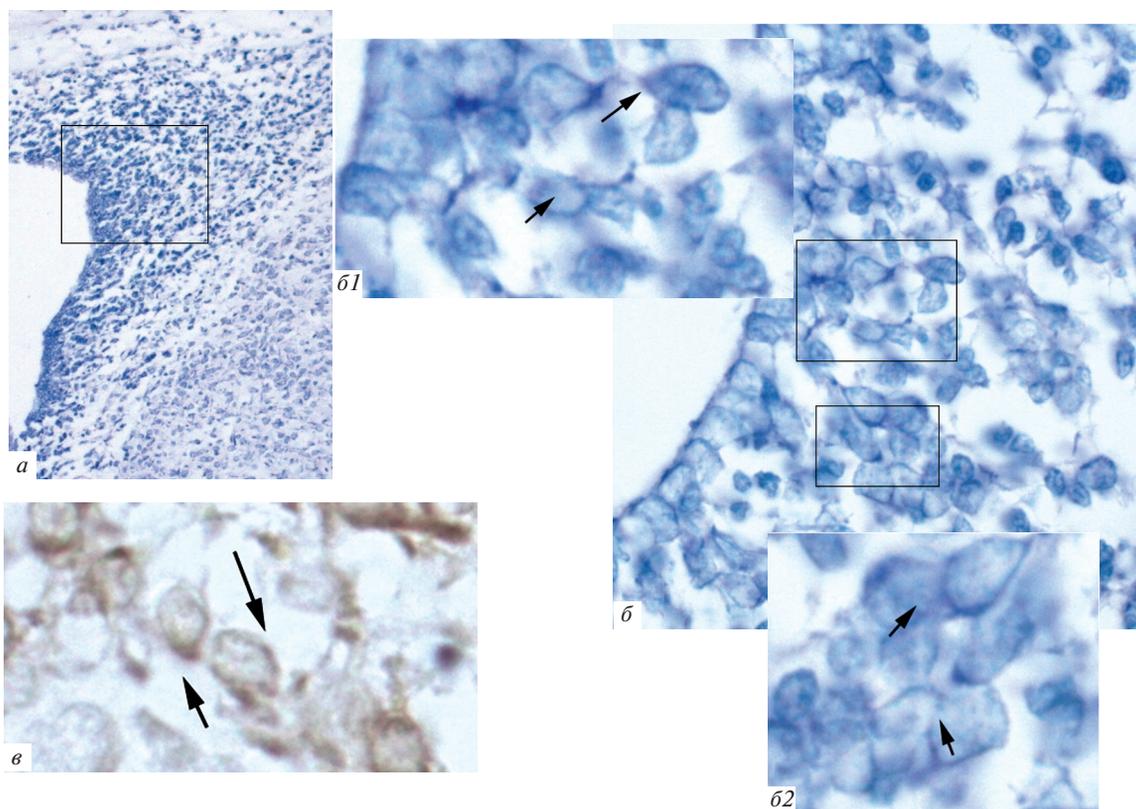


Рис. 1. Субвентрикулярная зона мозга крысы на П10. *a* – Область исследования (выделенный фрагмент), окраска по методу Ниссля; *b* – нейробласты, имеющие отростки и образующие цепочки (тип А) (*b1*, стрелки) и астроцитоподобные стволовые клетки (тип В) (*b2*, стрелки), окраска по методу Ниссля. *v* – Иммуногистохимическая реакция на β -III-tubulin, иммуноположительные клетки с отростками, образующие цепочки (тип А) (стрелки). Увел. об.: *a* – 10 \times , *b*, *v* – 100 \times .

единице площади) при увеличении объектива 100 \times . Подсчитывали число иммуноположительных клеток и общее количество всех типов клеток. Соотношение между ними выражали в процентах. Численный анализ данных осуществляли на изображениях, полученных с 10–12 гистологических срезов мозга, взятого от 4 животных каждой исследуемой возрастной группы при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0. Статистически обработанные данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., USA), различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Использованные реактивы: первичные кроличьи моноклональные антитела anti-beta-III-tubulin, клон [EP1569Y], первичные кроличьи поликлональные антитела anti-GABA antibody, anti-GABA $\alpha 1$ -рецептор antibody, вторичные антитела козы к иммуноглобулину кролика IgG H&L(HRP) (Abscam, Великобритания); вторичные антитела из набора LSAB + + System-HRP, хромоген DAB+ (Dako, Дания); вторичные антитела из набора реактивов EnVision + + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako-

Cytomation, США); метиленовый синий (Bio-Optica, Италия); синтетическая среда для заключения гистологических срезов Permaunt (Termo, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуногистохимическая реакция на β -III-тубулин. В неонатальный период (П5 и П10) в субвентрикулярной зоне мозга крыс присутствуют все типы клеток-предшественников, описанные ранее в СВЗ взрослого мозга (Platel et al., 2010): тип А – мигрирующие юные нейробласты (рис. 1*b1*, стрелки); тип В – малодифференцированные астроцитоподобные стволовые клетки (рис. 1*b2*, стрелки); тип С – транзиторные клетки малого размера, имеющие округлую форму тела; тип Е – эпендимные клетки, выстилающие полость латерального желудочка.

Для верификации дифференциации стволовых клеток СВЗ по нейрональному типу использовали иммуногистохимическое выявление β -III-тубулина (маркера ранней нейрональной дифференцировки). Картина распределения β -III-тубулина в клетках СВЗ на П5 и П10 имела сходный характер. Клетки эпендимы (тип Е), крупные малодифференцированные астроцитоподобные клетки (тип В), транзиторные клетки малого размера округлой или овальной формы (тип С) были иммунонегативны. Клетки,

имеющие веретеновидную или овальную форму, небольшой объем цитоплазмы и биполярные отростки, т.е. нейробласты (тип А) были иммунопозитивными при использовании антител к β -III-тубулину (рис. 1в, *длинные стрелки*). Они локализируются вблизи эпендимы, где образуют цепочки клеток, группы или располагаются одиночно, и встречаются по всей территории СВЗ. Анализ количества этих клеток на П5 и П10 показал, что на условной единице площади их число равно 46.2 ± 3.8 и 52.4 ± 3.3 клеток (соответственно), что составляет 31.1 и 33.3% от общего числа всех типов клеток (148.7 ± 4.3 и 157.5 ± 4.8 соответственно), расположенных на этой площади.

Таким образом, у крыс в неонатальный период (на П5 и П10) более 30% клеток СВЗ дифференцируются по нейрональному типу и представляют собой юные нейробласты.

Иммуногистохимическая реакция на ГАМК. На П5 в СВЗ присутствуют клетки иммуноположительные при использовании антител к ГАМК. Они имеют веретеновидную или округлую форму, светлое ядро, интенсивно иммуноокрашенную цитоплазму и два отростка, отходящих от противоположных сторон клетки. По морфологической характеристике они относятся к клеткам типа А, т.е. юным нейробластам. В дорсолатеральной части СВЗ отростки клеток имеют большую длину и варикозные расширения. Эти клетки локализируются вблизи эпендимных клеток, образуют цепочки или небольшие группы. Встречаются крупные астроцитоподобные клетки (тип В) с большим ядром и цитоплазмой в виде узкого ободка, которая иногда является иммунопозитивной. Клетки малого размера (тип С) и эпендимные клетки (тип Е) не окрашиваются при проведении иммуногистохимической реакции на ГАМК. Число иммуноположительных на ГАМК клеток равно 58.3 ± 6.5 клеток (на условной единице площади), что составляет 37.7% от общего числа клеток (154.7 ± 8.3) всех типов на этой площади.

На П10 в СВЗ также в большом количестве присутствуют клетки иммуноположительные на ГАМК. Среди них основную массу составляют клетки с отростками, т.е. нейробласты (тип А), в которых продукт иммуногистохимической реакции выявляется в цитоплазме в виде кольца, окружающего ядро, и в биполярных отростках (рис. 2, *длинные стрелки*). Также встречаются клетки типа В с иммуноокрашенной цитоплазмой (рис. 2, *короткая стрелка*). Число иммуноположительных на ГАМК клеток на условной единице площади составляет 71.4 ± 8.6 (различие этих показателей на П5 и П10 незначимо при $p < 0.05$), что составляет 44.0% от общего числа (162.2 ± 10.1) клеток всех типов на этой площади. Таким образом, у крыс во время неонатального периода (П5 и П10) около 40% клеток СВЗ содержат ГАМК.

Иммуногистохимическая реакция на ГАМК α 1. На П5 и П10 результаты иммуногистохимического выявления ГАМК α 1 в клетках СВЗ оказались идентичными. Подавляющее большинство клеток разных типов (тип А, тип В, тип С) СВЗ иммунополо-

жительны на ГАМК α 1. В межклеточном пространстве выявляется большое количество иммуноокрашенных отростков, имеющих разную длину и варикозные расширения. Интенсивность иммуноокрашивания клеток разных типов различна. Более интенсивно окрашены клетки с отростками, располагающиеся группами или образующие цепочки, т.е. юные нейробласты (тип А) (рис. 3, *длинные стрелки*). На П5 и П10 на условной единице площади число таких клеток составляет 56.5 ± 5.2 и 54.6 ± 5.6 , т.е. 36.7 и 39.9% соответственно от общего числа (153.2 ± 6.3 и 136.8 ± 7.6) всех клеток. Менее интенсивную иммунную реакцию на ГАМК α 1 имели клетки большего размера, с крупным ядром, т.е. стволые астроцитоподобные клетки (тип В) и часть мелких, округлой формы, транзиторных клеток (тип С) (рис. 3, *короткие стрелки*). Их общее количество составило 81.1 ± 6.8 и 71.0 ± 8.3 (соответственно) клеток на условной единице площади (52.9 и 51.8% соответственно от общего числа клеток на этой площади). Число иммунонегативных клеток (тип В и тип С), как на П5, так и на П10, была небольшой и составляла 15.6 ± 1.3 и 11.2 ± 1.9 (соответственно) клеток на условной единице площади (10.2 и 8.2% соответственно от общего числа клеток).

Таким образом, на П5 и П10 в СВЗ подавляющее число клеток (89.8 и 91.8%) иммуноположительны на ГАМК α 1, среди них выявляются клетки трех установленных типов: интенсивно иммуноокрашенные юные нейробласты, имеющие отростки (тип А), менее интенсивно иммуноокрашенные астроцитоподобные стволые клетки (тип В) и транзиторные клетки (тип С). На протяжении неонатального периода количество этих клеток поддерживается на постоянном уровне.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что в неонатальный период в СВЗ у крыс присутствуют все типы клеток-предшественников, ранее установленные в СВЗ взрослого мозга (Conover, Notti, 2008; Platel et al., 2010), при этом около 30% клеток дифференцируется по нейрональному типу и представляют собой мигрирующие юные нейробласты (тип А). На протяжении всего неонатального периода численность этих клеток остается постоянной.

Было установлено, что в неонатальный период значительная часть клеток СВЗ (около 40%) экспрессирует ГАМК, и численность этой популяции клеток-предшественников также является постоянной, как на более раннем сроке неонатального периода (П5), так и более позднем (П10). Полученные результаты согласуются с наблюдениями, сделанными ранее на культуре клеток СВЗ взрослого мозга, согласно которым клетками-предшественниками СВЗ, являющиеся нейробластами (тип А), синтезируют ГАМК и высвобождают ее в межклеточное пространство; при этом каждая клетка, содержащая ГАМК, иммуноположительна на глутаматдекарбок-

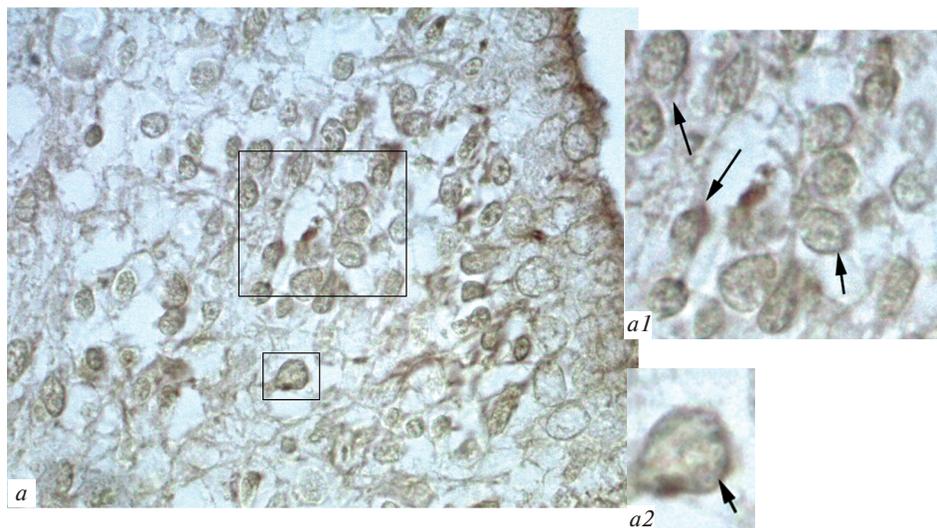


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление ГАМК в субвентрикулярной зоне мозга крысы на П10. Представлены ГАМК-позитивные нейробласты с отростками (тип А) (*a*, верхний фрагмент; *a1*, длинные стрелки) и ГАМК-позитивные астроцитоподобные стволовые клетки (тип В) (*a*, нижний фрагмент; *a2*, короткие стрелки). Увел. об. 100 \times .

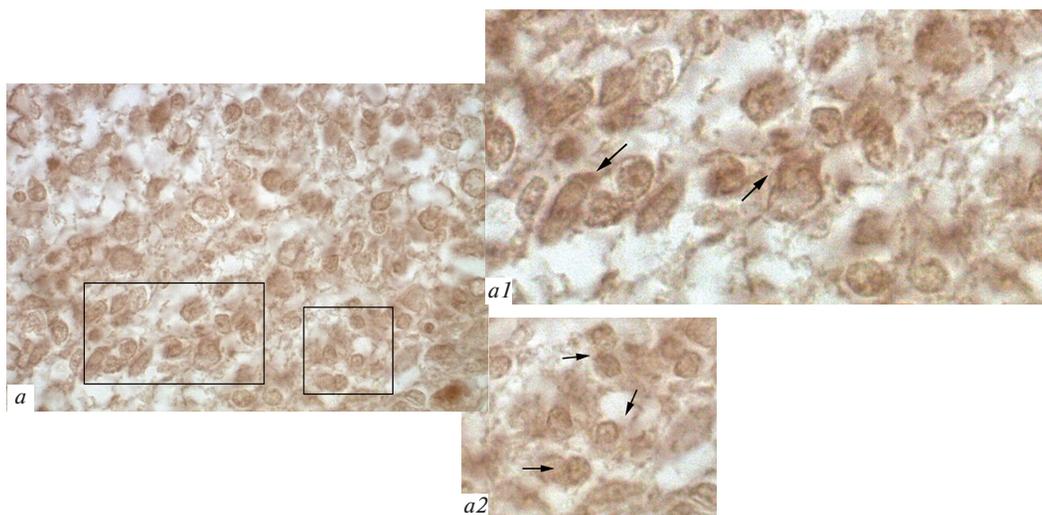


Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление ГАМК $_{\alpha 1}$ в субвентрикулярной зоне мозга крысы на П10. Представлены ГАМК $_{\alpha 1}$ -позитивные клетки с отростками (тип А) (*a*, левый фрагмент; *a1*, длинные стрелки) и ГАМК $_{\alpha 1}$ -позитивные транзиторные клетки (тип С) (*a*, правый фрагмент; *a2*, короткие стрелки). Увел. об. 100 \times .

силазу (GAD), фермент, участвующий в синтезе ГАМК (Stewart et al., 2002). Таким образом, эти клетки-предшественники содержат и ГАМК и GAD, что может свидетельствовать о присутствии в нейробластах ГАМК-синтезирующей ферментной системы.

Имеются данные о том, что клетки СВЗ экспрессируют высоко аффинные к ГАМК транспортные белки – GAT1 и GAT4, при этом последний экспрессируется астроцитоподобными клетками-предшественниками, которые могут осуществлять обратный захват ГАМК из межклеточного пространства (Volteus, Bordey, 2004; Platel et al., 2007). Вероятно, поэтому в СВЗ иммуноположительными на ГАМК могут быть не только нейробласты, но и астроцитоподобные клетки-предшественники, чем, по-види-

мому, можно объяснить повышенное число ГАМК-содержащих клеток (более 40%) по сравнению с числом дифференцирующихся нейробластов (30%).

Установлено, что в СВЗ взрослого мозга процесс возникновения нейробластов является постоянным и значительное количество нейробластов каждый день мигрируют из СВЗ в обонятельную луковицу (Lledo et al., 2006). Существует мнение (Platel et al., 2007), что при интенсивном производстве клеток необходим механизм контроля пролиферации нейральных стволовых клеток, миграции и выживаемости как стволовых клеток, так и самих нейробластов в микроокружении СВЗ. Так как в СВЗ постоянно генерируется значительная популяция нейробластов, то, как предполагается, в межклеточное про-

странство высвобождается большое количество ГАМК, синтезируемой нейробластами, которая, в свою очередь, является локальным фактором, служащим сигналом к активации ГАМК_A-рецепторов на нейрональных клетках-предшественниках (Nguyen et al., 2003). Следует отметить, что на электронно-микроскопическом и иммуногистохимическом уровнях было показано, что в СВЗ отсутствуют синапсы, и был сделан вывод, что передача сигналов ГАМК является паракринной (Platel et al., 2007, 2010).

Предполагается, что ГАМК высвобождается в межклеточное пространство и обеспечивает несинаптическую (паракринную) передачу сигналов как между нейробластами (Stewart et al., 2002; Wang et al., 2003; Nguyen et al., 2003; Bolteus, Bordey, 2004), так и от нейробластов к стволовым клеткам (Liu et al., 2005). При этом основой для передачи аутокринно/паракринного сигнала между нейрональными клетками-предшественниками является возбуждающее деполяризующее действие высвобождаемой ГАМК на клетки СВЗ (Liu et al., 2005). Известно, что действие ГАМК опосредуется рецепторами, и один из них – ГАМК_A – представлен 16 различными субъединицами, разные комбинации которых могут придавать рецептору различные свойства (Henschel et al., 2008). Во взрослом мозге быстрая ГАМКергическая синаптическая передача осуществляется при участии ГАМК_A-рецептора, включающего $\alpha 1$ -субъединицу. В исследованиях, проведенных на органных и клеточных культурах клеток СВЗ взрослого мозга, была выявлена экспрессия мРНК $\alpha 2$ -, 3-, 4-, 5-, $\beta 1$ -, 2-, 3-, $\gamma 2S$ -, $\gamma 1$ -, 2- и δ -субъединиц ГАМК_A-рецептора (Stewart et al., 2002; Nguyen et al., 2003). Однако в СВЗ в неонатальный период экспрессия $\alpha 1$ субъединицы ранее не изучалась.

Результаты нашего исследования показали, что в неонатальный период в СВЗ подавляющее число клеток (около 90%) оказались иммуноположительными на ГАМК_A $\alpha 1$, т.е. рецептор, включающий $\alpha 1$ -субъединицу экспрессируется как юными нейробластами (тип А), так и стволовыми астроцитоподобными клетками (тип В) и частично транзиторными клетками (тип С). Отмечено, что на протяжении всего неонатального периода сохраняется определенное количество клеток иммуноположительных на ГАМК и ГАМК_A $\alpha 1$, а также в СВЗ поддерживается общее количество всех типов клеток. Присутствие ГАМК_A- $\alpha 1$ -рецепторов в подавляющем числе клеток СВЗ дает основание полагать, что в неонатальный период ГАМК может оказывать влияние на поведение клеток разных типов.

Существует мнение, что при увеличении числа нейробластов, которое обеспечивается делением стволовых (тип В) и транзиторных клеток (тип С), в межклеточное пространство высвобождается значительное количество ГАМК, которая активирует ГАМК_A-рецепторы на самих нейробластах и нейрональных клетках-предшественниках. Результатом поступления нейротрансмиттера в клетки является

снижение пролиферативной активности стволовых клеток, т.е. контроль пролиферации стволовых клеток осуществляется по принципу обратной связи: увеличение уровня ГАМК в межклеточном пространстве приводит к снижению темпа пролиферации стволовых клеток, таким образом, ГАМК может оказывать негативное действие на образование нейробластов. Такая обратная связь согласуется с постоянной миграцией клеток из СВЗ в обонятельную луковицу и другие формации мозга. После миграции очередной популяции нейробластов снижается количество ГАМК в межклеточном пространстве, что способствует повышению пролиферативной активности стволовых нейрональных клеток (Doetsch et al., 1999; Nguyen et al., 2003; Bolteus, Bordey, 2004; Liu et al., 2005; Platel et al., 2010). Вероятно, такая система может обеспечить численное постоянство разных популяций клеток в СВЗ, что подтверждают полученные нами результаты.

Таким образом, наше исследование показало, что у крыс в СВЗ в неонатальный период, также как и в СВЗ взрослого мозга, присутствуют прогениторные клетки всех типов. Значительная их часть представлена юными нейробластами (тип А), которые дифференцируются по нейрональному типу; количество этих клеток остается постоянным на протяжении всего неонатального периода. В СВЗ юные нейробласты и часть астроцитоподобных стволовых клеток содержат ГАМК; число таких клеток также сохраняется постоянным на протяжении всего неонатального периода. В этот ранний период развития подавляющее большинство клеток СВЗ также содержат ГАМК_A- $\alpha 1$ -рецептор, количество ГАМК_A $\alpha 1$ -иммунопозитивных клеток также поддерживается примерно на одном уровне во время неонатального периода.

Предположение о существовании в СВЗ механизма, регулирующего темпы пролиферации и миграции нейрогенных клеток с участием ГАМК, косвенно подтверждается полученными данными, свидетельствующими о том, что в СВЗ поддерживается постоянное количество нейробластов, клеток, содержащих ГАМК, ГАМК_A $\alpha 1$ и общее число клеток. Присутствие ГАМК_A- $\alpha 1$ -рецепторов в подавляющем числе клеток СВЗ, дает основание предполагать, что в неонатальный период возможна ГАМКергическая несинаптическая передача сигналов между клетками СВЗ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052/21).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных живот-

ных. Протоколы экспериментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson D.J.* 2001. Stem cells and pattern formation in the nervous system: The possible versus the actual. *Neuron*. V. 30. P. 19.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00260-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00260-4)
- Bolteus A.J., Bordey A.* 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* V. 24. P. 7623.
- Conover J.R., Notti Q.* 2008. The neural stem cell niche. *Cell Tissue Res.* V. 331. P. 211.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0503-6>
- Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.* 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* V. 17. P. 5046.
- Doetsch F., Caille I., Lim D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.* 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* V. 97. P. 703.
- Hagg T.* 2005. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci.* V. 28. P. 589.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.009>
- Kreuzberg M., Kanov E., Timofeev O., Schwaninger M., Monyer H, Khodosevich K.* 2010. Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion. *Exp. Neurol.* V. 226. P. 90.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.00617>
- Liu X., Wang Q., Haydar T.F., Bordey A.* 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat. Neurosci.* V. 8. P. 1179.
- Lledo P.M., Alonso M., Grubb M.S.* 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 7. P. 179.
- Luskin M.B.* 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* V. 11. P. 173.
- Mercier F., Kitasako J.T., Hatton G.I.* 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J. Comp. Neurol.* V. 451. P. 170.
- Nguyen L., Malgrange B., Breuskin I., Bettendorff L., Moonen G., Belachew S., Rigo J.M.* 2003. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J. Neurosci.* V. 23. P. 3278.
- Paxinos G., Watson C.* 1998. The Rat brain in stereotaxic coordinates. London: Press.
- Peretto P., Merighi A., Fasolo A., Bonfanti L.* 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res. Bull.* V. 42. P. 9.
- Platel J.-C., Lacar B., Bordey A.J.* 2007. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J. Mol. Histol.* V. 38. P. 303.
<https://doi.org/10.1007/s10735-007-9103-8>
- Platel J.-C., Stamboulian S., Nguyen I., Bordey A.* 2010. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res. Rev.* V. 63. P. 60.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.004>
- Sanai N., Tramontin A.D., Quinones-Hinojosa A., Barbaro N.M., Gupta N., Kunwar S., Lawton M.T., McDermott M.W., Parsa A.T., Manuel-Garcia V.J., Berger M.S., Alvarez-Buylla A.* 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* V. 427. P. 740.
- Schlett K.* 2006. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Curr. Top. Med. Chem.* V. 6. P. 949.
- Stewart R.R., Hoge G.J., Zigova T., Luskin M.B.* 2002. Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *J. Neurobiol.* V. 50. P. 305.
- Swarzenski B.C., O'Malley K.L., Todd R.D.* 1996. PTX-sensitive regulation of neurite outgrowth by the dopamine D3 receptor. *Neuroreport.* V. 7. P. 573.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199601310-00047>
- Wang D.D., Krueger D.D., Bordey A.* 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABA_A receptor activation. *J. Physiol. (Lond).* V. 550. P. 785.

Immunohistochemical Detection of GABA and $\alpha 1$ Subunits of the GABA_A Receptor in Cells of the Subventricular Zone of the Rat's Brain in the Neonatal Period

L. I. Khozhai*

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: astarta0505@mail.ru

The aim of this work was to identify by immunocytochemical methods GABA and the $\alpha 1$ subunit of the GABA_A receptor in the neonatal period of development (5 and 10 postnatal days) in rats. The study showed that in rats in the subventricular zone (SVZ) in the neonatal period, as well as in the SVZ of the adult brain, all types of progenitor cells are present. A significant part of them (30%) differentiate according to the neuronal type, representing migrating adolescent neuroblasts (type A), the number of which remains constant throughout the neonatal period. Young neuroblasts and some astrocyte-like stem cells are immunopositive for GABA; the number of such cells is about 40% and remains constant throughout the neonatal period. It was revealed that the overwhelming majority of the SVZ cells, which are represented by young neuroblasts (type A), astrocyte-like stem cells (type B) and part of transient cells (type C) express GABA_A, a receptor containing the $\alpha 1$ subunit, the amount of which is maintained during the neonatal period. The presence of GABA $\alpha 1$ receptors in the overwhelming number of SVZ cells may indicate that GABAergic signaling is possible and that GABA can affect the behavior of different type SVZ cells.

Keywords: subventricular zone, neuronal stem cells, GABA, GABA_A $\alpha 1$, neonatal period

УДК 612.172.6:616-053.31-056.253-02+591.412

ВЛИЯНИЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО РОЖДЕНИЯ НА РАЗВИТИЕ МИОКАРДА КРЫС В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

© 2021 г. В. В. Иванова¹ *, И. В. Мильто^{1, 2}, О. Н. Серебрякова¹, И. В. Суходоло¹

¹Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, Томск, 634050 Россия

²Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства, Северск, 636013 Россия

*E-mail: ivvera92@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.06.2021 г.

После доработки 17.06.2021 г.

Принята к публикации 18.06.2021 г.

Развитие неонатологии позволяет преодолевать все более тяжелые степени недоношенности. Установлено, что преждевременное рождение человека ассоциировано с предрасположенностью к развитию во взрослом возрасте патологий сердечно-сосудистой системы, однако патогенетические механизмы этой связи не изучены. В настоящей работе изучено влияние преждевременного рождения на развитие миокарда левого желудочка крыс в течение 14 сут постнатального периода онтогенеза. Методами гистологии, иммуногистохимии и морфометрии проанализирован миокард левого желудочка самцов крыс Вистар, рожденных через 21 и 21.5 сут гестации (полный срок гестации составляет 22 сут). Относительная масса сердца преждевременно рожденных крыс превышает аналогичный показатель контрольных животных на 14 сут постнатального периода. Диаметр сократительных кардиомиоцитов крыс, рожденных на 21-е сут гестации, превышает аналогичный показатель доношенных животных на 1 сут постнатального периода онтогенеза. Преждевременное рождение у крыс вызывает увеличение количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов (маркер пролиферации) левого желудочка в раннем постнатальном периоде онтогенеза по сравнению с доношенными животными. Морфофункциональные изменения миокарда крыс тем выраженнее, чем меньше срок беременности. Таким образом, преждевременное рождение у крыс является причиной интенсификации роста миокарда в раннем постнатальном периоде онтогенеза.

Ключевые слова: преждевременное рождение, миокард, структура, крысы

DOI: 10.31857/S0041377121050060

По данным ВОЗ (2013 г.), каждый 10-й ребенок рождается недоношенным (т.е. ранее 37 полных недель гестации), причем причины преждевременного рождения в 45–50% случаев неизвестны. Преждевременное рождение у человека ассоциировано с предрасположенностью к развитию во взрослом возрасте заболеваний сердечно-сосудистой системы (Carr et al., 2017; Sullivan et al., 2019), однако патогенетические механизмы этой связи не изучены. Известно, что у преждевременно рожденных детей (32–36 нед. гестации) при рождении отмечается более сферическая форма сердца, а также сниженные относительная масса и объем сердца по сравнению с аналогичными показателями доношенных сверстников (Aye et al., 2017). У детей, рожденных недоношенными (22–26 нед. гестации), в возрасте 6 лет определяется уменьшение размеров левого желудочка и диаметра аортального отверстия левого желудочка.

Функциональными особенностями сердца преждевременно рожденных детей являются более кон-

центрическое сокращение левого желудочка и увеличение жесткости его стенки (Mohlkert et al., 2018). Уменьшение размеров обоих желудочков и изменение характера ротации сердца при его сокращении наблюдается у преждевременно рожденных (28–32 недели гестации) людей в возрасте 23–28 лет (Lewandowski et al., 2013). Выраженность структурных изменений камер сердца коррелирует со степенью недоношенности. У преждевременно рожденных детей определяется снижение миокардиального резерва в возрасте 18–40 лет (Huckstep et al., 2018). Рождение ранее 32 нед. гестации является независимым риском раннего развития гипертонической болезни и сердечной недостаточности (Carr et al., 2017).

Определение начальных морфофункциональных изменений сердца у преждевременно рожденных детей необходимо для предупреждения или коррекции отдаленных последствий недоношенности. Отсутствие возможностей гистологического и цитологического изучения клинического материала обуславливает необходимость проведения экспериментальных

исследований для изучения влияния преждевременного рождения на строение миокарда в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Целью данного исследования является оценка влияния преждевременного рождения на развитие миокарда крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Для достижения цели сформулированы задачи: (1) оценить динамику массы тела и массы сердца преждевременно рожденных крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза, (2) дать гистологическую и морфометрическую характеристику миокарда и (3) изучить динамику Ki67-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка преждевременно рожденных крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Дизайн исследования. В эксперименте использовано 75 самцов крыс Вистар, из которых были сформированы 3 группы: контрольная группа (доношенные крысы, 22 сут гестации), группа 1 (недоношенные крысы, 21.5 сут гестации) и группа 2 (недоношенные крысы, 21 сут гестации). Для получения потомства, самцов крыс Вистар (2-хмесячные, весом 180 ± 20 г) подсаживали на ночь к самкам крыс Вистар (3-хмесячные, весом 180 ± 20 г), находившихся на стадии проэструса полового цикла. Утром следующего дня анализировали влажалищные мазки самок крыс. Первым днем беременности считали день обнаружения у самок во влажалищном мазке сперматозоидов. Индукцию преждевременных родов через 21 и 21.5 сут беременности осуществляли накануне (20 и 20.5 сут беременности соответственно) подкожным введением самкам крыс мифепристона (1 мл, 10 мг на 1 кг массы тела; Sigma-Aldrich, США) (Dudley et al., 1996). Всех животных содержали в стандартных условиях вивария, беременных крыс содержали в отдельных клетках. Выведение потомства из эксперимента осуществляли на 1, 3, 5, 7 и 14 сут постнатального периода онтогенеза асфиксией CO_2 . Животных и их сердца взвешивали на лабораторных весах (NL-100, Япония). Сердца фиксировали в формалине (БиоВитрум, Россия) для последующего гистологического, иммуногистохимического и морфометрического исследования. Относительную массу сердца (%) крыс рассчитывали по формуле: $[\text{масса сердца (г)}/\text{масса крысы (г)}] \times 100\%$.

Гистология и иммуногистохимия. Через 12–24 ч фиксации в забуференном растворе формалина (рН 7.4) сердца крыс промывали в проточной воде, обезвоживали в Isorger (БиоВитрум, Россия) и пропитывали парафиновой смесью HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). Срезы толщиной 5 мкм получали на автоматическом микротоме (HM355S, Thermo Fisher Scientific, Китай). Для гистологического изучения срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Для иммуногистохимии срезы монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием. На срезах выявляли Ki67-позитивные клетки (про-

лиферирующие клетки), используя в качестве первичных антител ab16667 (Anti-Ki67 antibody [SP6] в разведении 1 : 300). Проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0.01 M; рН 6.0), затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 45 мин при комнатной температуре (25°C). Первичные антитела визуализировали при помощи системы детекции Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer (Abcam, Великобритания), после чего срезы докрашивали гематоксилином Джилла. Постановку отрицательного контроля осуществляли нанесением на срезы вместо первичных антител раствора для разведения антител Ab Diluent (Abcam, Великобритания).

Микроскопия образцов. Исследование микропрепаратов и фотосъемку осуществляли на световом микроскопе Axioscope 40 (Zeiss, Германия) с помощью цифровой камеры CanonG5 (Canon, Китай).

Морфометрия. На гистологических препаратах сердца крыс при помощи программы ImageJ 1.48 (НИН, США) измеряли толщину стенки левого желудочка, а также диаметр сократительных кардиомиоцитов левого желудочка. Подсчитывали количество Ki67-позитивных кардиомиоцитов в 1 мм² площади среза стенки левого желудочка.

Статистическая обработка данных. Анализ морфометрических показателей проводили при помощи SPSS 16.0 (IBM, USA) с использованием критериев Шапиро–Уилка и Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы и квартилей – Me (Q₁; Q₃). Различия между показателями считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение преждевременно рожденного потомства. Продолжительность беременности контрольных крыс Вистар составляет 22 сут. В 100% случаев через 18–24 ч после введения беременным крысам мифепристона наблюдается начало преждевременных родов. Помет составляет в среднем 12 ± 2 особей. Гибель отдельных крыс (1–2 животное из помета) в группе 2 (недоношенные крысы, 21 сут гестации) наблюдали на 1–2 сут постнатального периода онтогенеза. Гибели крыс в контрольной группе и группе 1 (недоношенные крысы, 21.5 сут гестации) в исследуемые сроки не наблюдали.

Показатели массы тела и сердца крыс. Ранний постнатальный период онтогенеза крыс сопровождается динамичным изменением массы животных. Масса крыс в группах 1 и 2 ниже, чем у контрольных животных на всем протяжении эксперимента (табл. 1). Масса крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза тем меньше, чем меньше срок гестации.

Масса сердца крыс всех исследуемых групп увеличивается с 1 по 14 сут постнатального периода онтогенеза. Масса сердца преждевременно рожденных

Таблица 1. Динамика сердечных показателей крыс контрольных (22 сут гестации) и преждевременно рожденных через 21. 5 сут гестации (группа 1) и через 21 сут гестации (группа 2)

Группа	Срок эксперимента, сут				
	1	3	5	7	14
Масса крыс, г					
Контроль	6.01 (5.71; 6.20)	8.13 (7.63; 8.45) ^a	11.20 (10.95; 11.60) ^a	16.31 (14.74; 16.53) ^a	34.80 (32.36; 36.76) ^a
1	5.56 (5.18; 5.83) ^б	6.85 (6.23; 7.41) ^б	10.34 (9.88; 10.75) ^{a, б}	14.59 (13.10; 14.85) ^a	29.30 (28.00; 29.79) ^{a, б}
2	4.32 (4.21; 4.57) ^{б, в}	6.57 (6.23; 7.05) ^{a, б}	9.02 (8.14; 9.50) ^{a, б, в}	12.37 (10.72; 13.33) ^б	25.32 (23.93; 25.97) ^{a, б, в}
Масса сердца, г					
Контроль	0.05 (0.04; 0.06)	0.06 (0.06; 0.07)	0.11 (0.09; 0.12) ^a	0.11 (0.10; 0.12)	0.20 (0.17; 0.23) ^a
1	0.05 (0.04; 0.06)	0.05 (0.05; 0.05) ^б	0.07 (0.07; 0.09) ^{a, б}	0.10 (0.09; 0.11) ^a	0.26 (0.21; 0.27) ^a
2	0.03 (0.03; 0.04)	0.05 (0.04; 0.05) ^{a, б}	0.07 (0.07; 0.08) ^б	0.09 (0.09; 0.10) ^{a, б}	0.19 (0.16; 0.22) ^a
Относительная масса сердца, %					
Контроль	0.83 (0.68; 0.96)	0.80 (0.72; 0.91)	0.94 (0.86; 1.02)	0.72 (0.61; 0.78) ^a	0.55 (0.52; 0.66) ^a
1	0.89 (0.61; 1.07)	0.73 (0.60; 0.81)	0.70 (0.65; 0.80) ^б	0.68 (0.65; 0.81)	0.87 (0.74; 0.93) ^б
2	0.72 (0.60; 0.86)	0.70 (0.63; 0.79)	0.83 (0.71; 0.93)	0.69 (0.67; 0.77)	0.75 (0.66; 0.84) ^б
Толщина стенки левого желудочка, мкм					
Контроль	409.1 (360.1; 588.5)	444.2 (417.2; 539.0)	502.2 (418.7; 557.6)	745.0 (590.5; 867.8) ^a	854.0 (704.5; 890.0)
1	412.0 (390.7; 465.2)	413.4 (409.5; 496.5)	619.5 (486.6; 670.7) ^a	748.4 (680.2; 822.7) ^a	570.6 (529.7; 795.9) ^a
2	322.0 (284.9; 469.4)	465.5 (443.7; 573.9)	628.9 (557.4; 691.0) ^a	684.9 (606.7; 796.5)	815.2 (625.1; 878.8)
Диаметр сократительных кардиомиоцитов левого желудочка, мкм					
Контроль	7.0 (6.2; 8.2)	8.9 (7.1; 9.9) ^a	7.9 (6.9; 9.6)	10.4 (8.9; 11.8) ^a	9.7 (9.1; 11.3)
1	8.1 (7.0; 8.5)	6.6 (6.5; 9.7)	8.1 (6.7; 9.4)	8.5 (7.7; 10.2)	8.9 (8.4; 9.7)
2	8.5 (7.4; 9.6) ^б	8.1 (7.1; 9.3)	8.8 (8.0; 11.0)	8.9 (7.4; 10.8)	8.3 (7.9; 9.5)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего (Q₁) и верхнего (Q₃) квартилей. Различия достоверны при $p < 0.01$ при сравнении с соответствующим показателем (^a) на предыдущем сроке, (^б) в контрольной группе и (^в) в группе 1.

крыс ниже, чем у контрольных животных, начиная с первых суток, по 7–14 сут постнатального периода онтогенеза (табл. 1). Снижение массы сердца у крыс сохраняется тем дольше, чем меньше срок гестации.

В группе контрольных животных относительная масса сердца уменьшается в ходе эксперимента. У крыс групп 1 и 2 относительная масса сердца превышает аналогичный показатель контрольных животных на 14 сут постнатального периода онтогенеза (табл. 1).

Характеристика миокарда левого желудочка крыс.

Толщина стенки левого желудочка крыс всех исследуемых групп возрастает в постнатальный период онтогенеза в течение всего срока наблюдения (1–14 сут). Толщина стенки левого желудочка преждевременно рожденных крыс не отличается от аналогичного показателя доношенных животных в исследуемые сроки (табл. 1).

Миокард левого желудочка крыс образован тремя слоями кардиомиоцитов, разделенных тонкими

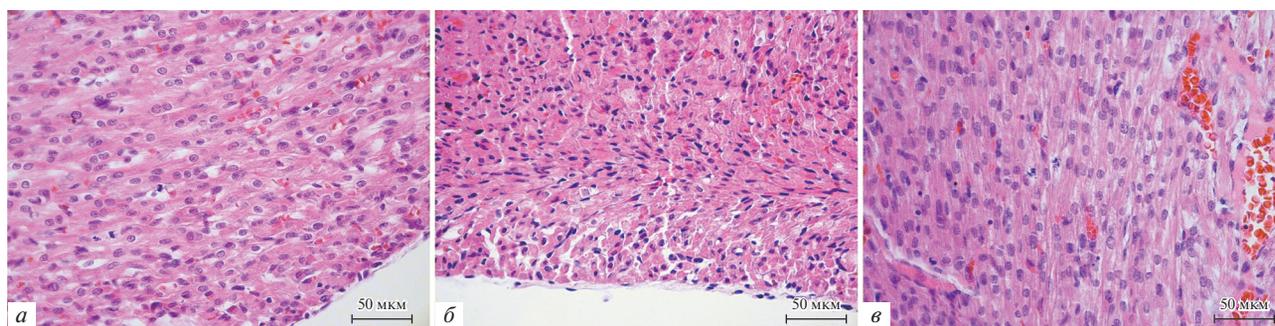


Рис. 1. Гистологический препарат миокарда левого желудочка крысы на 7 сут постнатального периода онтогенеза. (а) – Контрольная группа, 22 сут гестации; (б) – группа 1, срок гестации 21.5 сут, (в) – группа 2, срок гестации 21 сут. Окраска гематоксином и эозином.

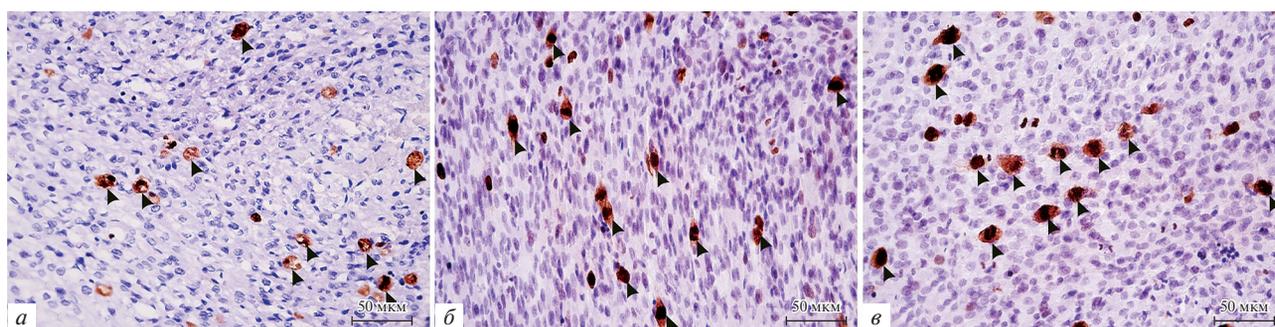


Рис. 2. Срез миокарда левого желудочка крысы на 3 сут постнатального периода онтогенеза, окрашенный на выявление Ki67-положительных кардиомиоцитов. (а) – Контрольная группа, 22 сут гестации; (б) – группа 1, срок гестации 21.5 сут, (в) – группа 2, срок гестации 21 сут. *Головки стрелок* указывают на маркер Ki67. Иммуногистохимическая окраска с докраской гематоксилином Джилла.

прослойками соединительной ткани. В ходе постнатального периода онтогенеза у крыс всех исследуемых групп увеличивается эозинофилия, а также выраженность поперечной исчерченности цитоплазмы сократительных кардиомиоцитов левого желудочка (рис. 1). На протяжении эксперимента в миокарде крыс всех исследуемых групп определяются фигуры митоза кардиомиоцитов. Двухъядерные кардиомиоциты определяются в миокарде левого желудочка крыс и контрольной, и обеих экспериментальных групп, начиная с 1 сут постнатального периода онтогенеза. Количество двухъядерных кардиомиоцитов в миокарде крыс в контрольной, 1-ой и 2-ой группе визуально увеличивается в ходе эксперимента. Установлено, что диаметр сократительных кардиомиоцитов левого желудочка крыс 2-ой группы превышает аналогичный показатель животных контрольной группы в первые сутки постнатального периода онтогенеза (табл. 1). Различий диаметра сократительных кардиомиоцитов левого желудочка крыс в контрольной, 1-ой и 2-ой группе с 3 по 14 сут постнатального периода онтогенеза не наблюдали.

Выявление Ki67-положительных клеток миокарда крыс. В стенке левого желудочка крыс исследуемых

групп Ki67-положительное окрашивание характерно для делящихся кардиомиоцитов, эндотелиоцитов и фибробластов (рис. 2). Ki67-положительные кардиомиоциты в стенке левого желудочка крыс контрольной, 1-ой и 2-ой групп определяют в субэпикардальных, средних и субэндокардиальных участках с 1 по 14 сут постнатального периода онтогенеза. Динамика количества Ki67-положительных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс всех групп отражена на графике (рис. 3). Изменение количества Ki67-положительных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс в 1-ой и контрольной группе носят схожий характер. Однако количество Ki67-положительных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс 1-ой группы превышает соответствующий показатель контрольных животных на 3, 7 и 14 сут пренатального периода онтогенеза. У крыс группы 2 наблюдается более раннее увеличение количества Ki67-положительных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка по сравнению с таковым у животных контрольной и 1-ой групп. Уменьшение количества Ki67-положительных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка у крыс группы 2 также наблюдается раньше, чем у контрольных животных и в группе 1.

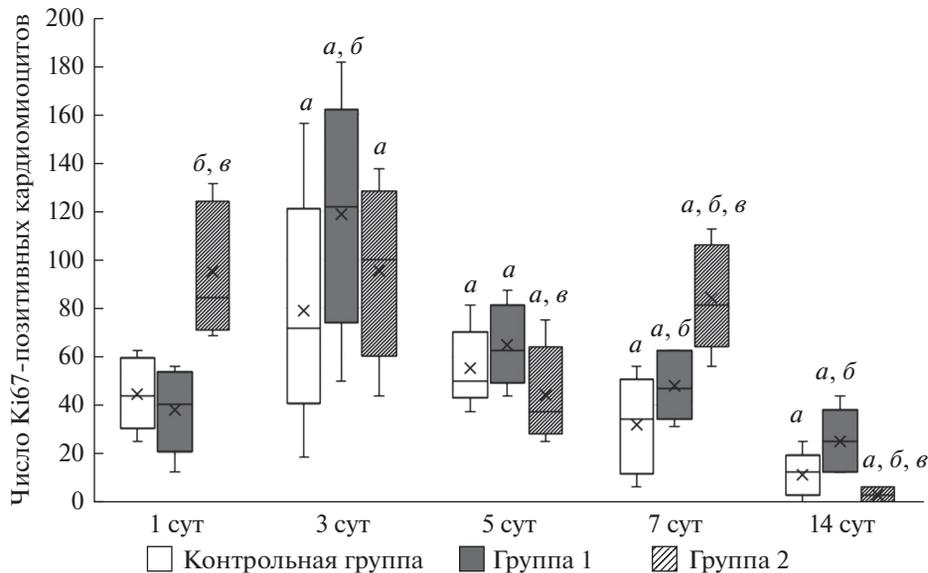


Рис. 3. Динамика числа Ki67-позитивных кардиомиоцитов на 1 мм² среза миокарда левого желудочка доношенных крыс (контрольных) и недоношенных, рожденных через 21.5 сут (группа 1) и 21 сут (группа 2) в течение 14 сут постнатального периода онтогенеза. Результаты представлены в виде медианы (Me) и нижнего (Q₁) и верхнего (Q₃) квартилей, крестики показывают среднее значения показателя; различия достоверны при $p < 0.01$ при сравнении с соответствующим показателем предыдущего срока той же группы (a), контрольной группы (b) и показателя группы 1 (v).

ОБСУЖДЕНИЕ

Преждевременное рождение связано с повышенными гемодинамическими нагрузками на структурно незрелое сердце, что может быть причиной адаптивного ремоделирования миокарда. Структурные изменения миокарда, вызванные преждевременным рождением, вероятно, носят персистирующий характер (Bensley et al., 2010). Выявление структурных изменений миокарда, вызванных преждевременным рождением, является актуальной задачей.

Период с 18 по 22 сут пренатального периода онтогенеза крыс Вистар соответствует третьему триместру беременности у человека (Тоуно и др., 1999). Анатомически сердце крысы сформировано к 16-м сут пренатального периода онтогенеза, однако вплоть до 22 сут пренатального периода онтогенеза продолжается его рост и созревание. За последние сутки пренатального периода онтогенеза у крыс увеличивается масса и объем левого желудочка, масса правого желудочка, площадь левого атриовентрикулярного отверстия (Ito et al., 1998, 2001). Мы считаем, что преждевременно рожденные (через 21 и 21.5 сут гестации) крысы могут быть использованы для изучения влияния недоношенности на морфофункциональное состояние миокарда.

Нами показано, что недоношенность у крыс ассоциирована с низкой массой тела при рождении, что согласуется с данными из литературы (Buhrdel et al., 1978a). Более низкая масса тела у преждевременно рожденных крыс на 1–7 сут постнатального периода онтогенеза, по сравнению с доношенными живот-

ными, сопровождается закономерным снижением массы сердца (Buhrdel et al., 1978b).

Мы показали, что, несмотря на более низкие абсолютные величины, относительная масса сердца преждевременно рожденных крыс превышает аналогичный показатель контрольных животных на 14 сут эксперимента. Снижение абсолютной массы сердца преждевременно рожденных крыс не сопровождается снижением толщины стенки левого желудочка в исследуемые сроки. Более того, преждевременное рождение крыс приводит к интенсификации роста миокарда в раннем постнатальном периоде развития, о чем свидетельствует увеличение количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов в миокарде преждевременно рожденных крыс.

У крыс рост миокарда в пренатальном периоде онтогенеза протекает, в основном, по гиперпластическому типу (Xavier-Vidal et al., 1997), тогда как в раннем постнатальном периоде онтогенеза он обусловлен как гиперплазией, так и гипертрофией кардиомиоцитов. Переход с гиперпластического на гипертрофический тип роста миокарда крыс происходит на 3–4 сутки постнатального периода онтогенеза (Li et al., 1996).

Ki67 является неспецифичным маркером пролиферации, который не позволяет дифференцировать две популяции кардиомиоцитов: 1) проходящие истинный митоз и 2) претерпевающие эндорепликацию. Истинный митоз кардиомиоцитов приводит к увеличению пула одноядерных диплоидных кардиомиоцитов и отражает гиперпластический тип роста миокарда. Эндорепликация кардиомиоцитов явля-

ется основой гипертрофического типа роста и заключается в прохождении кардиомиоцитами кариокинеза без цитотомии, в результате которого образуются полиплоидные многоядерные кардиомиоциты. Большой диаметр сократительных кардиомиоцитов стенки левого желудочка на 1 сут постнатального периода онтогенеза у преждевременно рожденных крыс, в сравнении с доношенными животными, может указывать на более ранний переход кардиомиоцитов преждевременно рожденных животных от гиперпластического типа роста к гипертрофическому типу.

Известно, что эндорепликация и формирование двуядерных кардиомиоцитов может быть ответной реакцией на стрессовое воздействие (Landim-Vieira et al., 2020). Показано, что у новорожденных мышей и крыс повреждение миокарда сопровождается практически полным его восстановлением за счет активации пролиферативной активности кардиомиоцитов. Однако регенераторный потенциал миокарда в раннем постнатальном периоде онтогенеза реализуется не за счет гиперплазии, а за счет эндорепликации и формирования двуядерных кардиомиоцитов (Zebrowski et al., 2017).

Гипертрофия кардиомиоцитов сопровождается увеличением их линейных размеров и связана с усилением их сократительной функции, однако сопровождается потерей способности претерпевать истинный митоз. Более ранний переход миокарда с гиперпластического на гипертрофический тип роста приводит к уменьшению абсолютного количества кардиомиоцитов и, следовательно, снижению миокардиального резерва (Lewandowski et al., 2020). Известно, что масса животного при рождении положительно коррелирует с количеством кардиомиоцитов в левом желудочке и межжелудочковой перегородке в половозрелом возрасте (Vranas et al., 2017). У преждевременно рожденных детей в возрасте 13 и 25 лет масса и размер желудочков меньше аналогичных показателей доношенных сверстников (Goss et al., 2020).

Таким образом, преждевременное рождение крыс приводит к увеличению количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Молекулярно-функциональные изменения миокарда более выражены у крыс, рожденных на 21-е сут, чем у рожденных через 21.5 сут животных. Однако требуется дополнительное исследование, целью которого будет верификация интенсификации эндомитоза кардиомиоцитов в результате преждевременного рождения животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность руководителю отделения рентгеновских и томографических методов диагностики НИИ кардиологии Томского НИМЦ РАН В.Ю. Усову.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена на средства гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (решение Конкурсной комиссии Минобрнауки России, протокол № 4 от 27.12.2019 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и при соблюдении требований Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протокол исследования одобрен решением локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России № 8475/1 от 30.11.2020.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aye C., Lewandowski A.J., Lamata P., Upton R., Davis E., Ohuma E.O., Kenworthy Y., Boardman H., Wopperer S., Packham A., Adwani S., McCormick K., Papageorghiou A.T., Leeson P. 2017. Disproportionate cardiac hypertrophy during early postnatal development in infants born preterm. *Pediatr. Res.* V. 82. P. 36.
- Bensley J.G., Stacy V.K., De Matteo R., Harding R., Black M.J. 2010. Cardiac remodelling as a result of pre-term birth: implications for future cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* V. 31. P. 2058.
- Buhrdel P., Keller E., Willgerodt H., Theile H. 1978. The postnatal development of rats born preterm and postterm. II. Liver, brain, heart and kidneys. *Biol. Neonate.* V. 33. P. 240.
- Buhrdel P., Willgerodt H., Keller E., Theile H. 1978. Postnatal development of rats born preterm and postterm. I. Body weight. *Biol. Neonate.* V. 33. P. 184.
- Carr H., Cnattingius S., Granath F., Ludvigsson J.F., Edstedt Bonamy A.K. 2017. Preterm birth and risk of heart failure up to early adulthood. *J. Am. Coll. Cardiol.* V. 69. P. 2634.
- Dudley D.J., Branch D.W., Edwin S.S., Mitchell M.D. 1996. Induction of preterm birth in mice by RU486. *Biol. Reprod.* V. 55. P. 992.
- Goss K.N., Haraldsdottir K., Beshish A.G., Barton G.P., Watson A.M., Palta M., Chesler N.C., Francois C.J., Wieben O., Eldridge M.W. 2020. Association Between Preterm Birth and Arrested Cardiac Growth in Adolescents and Young Adults. *JAMA Cardiol.* V. 5. P. 910.
- Huckstep O.J., Williamson W., Telles F., Burchert H., Bertagnolli M., Herdman C., Arnold L., Smillie R., Mohamed A., Boardman H., McCormick K., Neubauer S., Leeson P., Lewandowski A.J. 2018. Physiological Stress Elicits Impaired Left Ventricular Function in Preterm-Born Adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* V. 71. P. 1347.
- Ito T., Orino T., Harada K., Takada G. 1998. Morphological maturation of left ventricle in fetal rats: changes in left ven-

- tricular volume, mass, wall thickness, and mitral valvular size. *Early Hum. Dev.* V. 53. P. 1.
- Ito T., Harada K., Takada G. 2001. In situ morphometric analysis of left and right ventricles in fetal rats: changes in ventricular volume, mass, wall thickness, and valvular size. *The Tohoku journal of experimental medicine.* V. 193. P. 37.
- Landim-Vieira M., Schipper J.M., Pinto J.R., Chase P.B. 2020. Cardiomyocyte nuclearity and ploidy: when is double trouble? *J. Muscle Res. Cell Motil.* V. 41. P. 329.
- Le B., Sutherland M.R., Black M.J. 2018. Maladaptive structural remodelling of the heart following preterm birth. *Current Opinion Physiol.* V. 1. P. 89.
- Lewandowski A.J., Augustine D., Lamata P., Davis E.F., Lazdam M., Francis J., McCormick K., Wilkinson A.R., Singhal A., Lucas A., Smith N.P., Neubauer S., Leeson P. 2013. Preterm heart in adult life: cardiovascular magnetic resonance reveals distinct differences in left ventricular mass, geometry, and function. *Circulation.* V. 127. P. 197.
- Lewandowski A.J., Levy P.T., Bates M.L., McNamara P.J., Nuyt A.M., Goss K.N. 2020. Impact of the Vulnerable Preterm Heart and Circulation on Adult Cardiovascular Disease Risk. *Hypertension.* V. 76. P. 1028.
- Li F., Wang X., Capasso J.M., Gerdes A.M. 1996. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* V. 28. P. 1737.
- Mohlkert L.A., Hallberg J., Broberg O., Rydberg A., Halvorsen C.P., Liuba P., Fellman V., Domellöf M., Sjöberg G., Norman M. 2018. The preterm heart in childhood: Left ventricular structure, geometry, and function assessed by echocardiography in 6-year-old survivors of periviable births. *J. Am. Heart Assoc.* V. 7. e007742.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007742>
- Sullivan M.C., Winchester S.B., Msall M.E. 2019. Prematurity and cardiovascular risk at early adulthood. *Child: Care, health and development.* V. 45. P. 71.
- Toyono M., Ito T., Harada K., Tamura M., Takada G. 1999. Morphological adaptation of the cardiovascular system in fetal rats during late gestation. *Tohoku J. Exper. Med.* V. 188. P. 299.
- Vranas S., Heinemann G.K., Liu H., De Blasio M.J., Owens J.A., Gatford K.L., Black M.J. 2017. Small size at birth predicts decreased cardiomyocyte number in the adult ovine heart. *J. Dev. Origins Health Dis.* V. 8. P. 618.
- Xavier-Vidal R., Cunha R.C., Madi K. 1997. Quantitative study using semithin section of the rat fetal myocardium. *Revista Chilena de Anatomía.* V. 15. P. 209.
- Zebrowski D.C., Jensen C.H., Becker R., Ferrazzi F., Baun C., Hvidsten S., Sheikh S.P., Polizzotti B.D., Andersen D.C., Engel F.B. 2017. Cardiac injury of the newborn mammalian heart accelerates cardiomyocyte terminal differentiation. *Sci. Rep.* V. 7. 8362.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08947-2>

Influence of Preterm Birth on the Rat Myocardium Development in the Early Postnatal Period of Ontogenesis

V. V. Ivanova^{a, *}, I. V. Milto^{a, b}, O. N. Serebrjakova^a, and I. V. Suhodolo^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^b Seversk Biophysical Research Centre, Seversk, 636013 Russia

*e-mail: ivvera92@rambler.ru

Development of neonatology makes possible to overcome more and more severe degrees of prematurity. It has been established that preterm birth in humans is associated with a predisposition to the cardiovascular system pathologies development in adulthood; however, the pathogenetic mechanisms of this relationship have not been studied. The work studied the effect of preterm birth on the development of the left ventricular myocardium in rats during 14 d of the postnatal period of ontogenesis. The myocardium of the left ventricle of male Wistar rats born on days 21 and 21.5 of gestation (the total gestational age is 22 days) was analyzed with histological, immunohistochemical and morphometric methods. The relative heart mass of preterm rats exceeds that of control animals on the 14 d of the experiment. The diameter of the contractile cardiomyocytes of rats born on the 21 day of gestation exceeds that of term animals on the 1st day of the postnatal period of ontogenesis. Preterm birth in rats causes an increase in number of Ki67-positive left ventricular cardiomyocytes in the early postnatal period of ontogenesis, in comparison with term animals. The morpho-functional changes in the rat myocardium are the more pronounced, the shorter the gestational age. Thus, preterm birth in rats results in the intensification of myocardial growth in the early postnatal period of ontogenesis.

Keywords: preterm birth, myocardium, structure, rats

УДК 57.085.23

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КУЛЬТУРЫ МАКРОФАГОВ КОСТНОГО МОЗГА, СТИМУЛИРОВАННЫХ АМИНОДИГИДРОФТАЛАЗИНДИОНОМ НАТРИЯ *IN VITRO*

© 2021 г. В. А. Поздина^{1, *}, У. В. Зведенинова², М. В. Улитко^{3, 4}, И. Г. Данилова^{1, 4}, М. Т. Абидов⁵

¹Институт Иммунологии и Физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, 620049 Россия

²Уральский Государственный Медицинский Университет, Екатеринбург, 620028 Россия

³Институт естественных наук и математики Уральского Федерального Университет, Екатеринбург, 620026 Россия

⁴Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, 620026 Россия

⁵Институт иммунологии и профилактической медицины, Любляна, 1000 Словения

*E-mail: varvara.pozdina@gmail.com

Поступила в редакцию 27.05.2021 г.

После доработки 10.06.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

В работе исследовали морфометрические и иммунофенотипические характеристики макрофагов костного мозга крыс, выделенных из интактных животных и стимулированных аминоксидогидрофталазиндионом натрия (АДФН) в условиях культивирования в течение 24, 48 и 72 ч. Определяли следующие морфометрические показатели: площадь клетки, цитоплазмы и ядер, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Пролиферативную активность оценивали по наличию маркера Ki-67. Фенотип макрофагов определяли по маркерам CD163 (M2-фенотип) и F4/80 (M1-фенотип), присутствующим на поверхности клеток. Кроме того, оценивали содержание фактора роста TGF- β в цитоплазме макрофагов. Стимуляция макрофагов АДФН в дозе 50 мкг/мл АДФН способствует росту количества CD163⁺-клеток и содержания этого маркера с увеличением срока культивирования. Действие 100 мкг/мл АДФН, наоборот, с увеличением времени культивирования приводит к повышению доли F4/80⁺-клеток в культуре и росту содержания этого маркера. Накопление TGF- β происходит к 48 ч культивирования клеток в присутствии 50 мкг/мл АДФН, и его повышенные количества сохраняются в течение 72 ч. АДФН в дозе 100 мкг/мл усиливает образование TGF- β к 48 ч, и угнетает его к 72 ч культивирования клеток с веществом. При добавлении АДФН в культуру моноцитов ускоряется созревание макрофагов, а также вещество обладает выраженным дозозависимым действием на макрофаги КМ.

Ключевые слова: макрофаги, костный мозг, аминоксидогидрофталазиндион натрия

DOI: 10.31857/S0041377121050096

Собственные макрофаги костного мозга (КМ) – клетки иммунной системы, обладающие активной подвижностью, адгезивностью и выраженной способностью к фагоцитозу, а также выполняющие ряд уникальных функций, связанных с регуляцией процесса кроветворения. Этот тип клеток имеет мезенхимное происхождение и в постнатальном онтогенезе дифференцируется из стволовой кроветворной клетки, проходя в КМ последовательно 3 стадии созревания: монобласт → промоноцит → моноцит. В настоящее время известно о 3-х основных популяциях резидентных макрофагов КМ: центральные макрофаги внутри эритробластических островков

(ЭО), популяция резидентных макрофагов КМ, участвующих в поддержании гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), или нишевые макрофаги ГСК, и остеомаки – макрофаги, выстилающие кость, включая эндост (Winker et al., 2010; Sinder et al., 2015).

Первая популяция – макрофаги внутри ЭО. Их уникальность состоит в том, что они обеспечивают выживание эритробластов во время их созревания для образования ретикулоцитов. Макрофаги ЭО также экспрессируют молекулы адгезии, такие как молекулы адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), которые опосредуют сцепление эритробластов и макрофагов ЭО (Ulyanova et al., 2011; Jacobsen et al., 2014). Функция макрофагов ЭО подразделяется на три большие категории: 1) секреция широкого спектра цитокинов и факторов роста, 2) транспорт железа и 3) фагоцитоз и деградация ядер клеток-предше-

Принятые сокращения: ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка; КМ – костный мозг; ППС – полная питательная среда; ЭО – эритробластический островок (erythroblastic island macrophages); NO – оксид азота.

ственников эритроцитов (Kawane et al., 2001; Toda et al., 2014). Макрофаги ЭО могут секретировать эритропоэтин (EPO) – фактор роста, регулирующий эритропоэз, а также другие факторы, которые способствуют эритропоэзу, включая инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) и костный морфогенетический белок-4 (BMP-4) (Liu et al., 2015; Tonkin et al., 2015). Для макрофагов ЭО характерна следующая комбинация миелоидно-макрофагальных маркеров: CD11b, F4/80, CD169, EIM-ассоциированный антиген ER-HR3 и традиционный гранулоцитарный антиген Ly6G (Sonoda, Sasaki, 2008; Chow et al., 2011; Jacobsen et al., 2014). Особенной пластичностью макрофаги ЭО не обладают в связи с узкоспециализированными функциями.

Вторая популяция – макрофаги, локализующиеся в микросреде ниши ГСК и поддерживающие ее гомеостаз (Chang et al., 2008). Их вероятная функция была оценена с использованием моделей истощения макрофагов, включая трансгенных мышей Maf1a, и моделей гематопоезического стресса (Winkler et al., 2010; Chow et al., 2011; Christopher et al., 2011). Данные свидетельствуют о том, что макрофаги этой популяции регулируют пролиферацию и созревание ГСК прямым и непрямым образом (Winkler et al., 2010; Jacobsen et al., 2014; Dutta et al., 2015; Hur et al., 2016). В частности, было продемонстрировано, что связывание рецептора CD234 эритроцитов с макрофагами ниши ГСК стабилизирует поверхностный рецептор CD82, экспрессируемый ГСК, находящимися в эндостальных артериолярных областях КМ, и способствует покою ГСК (Hur et al., 2016). Уменьшение доли макрофагов CD234⁺ в КМ, приводило к понижению доли CD82⁺ ГСК, тем самым стимулируя пролиферацию и дифференцировку этих клеток (Hur et al., 2016). Фенотип ГСК-макрофагов в настоящее время определяется следующим набором экспрессируемых маркеров: CD11b, F4/80, Ly6Gneg, CD169, VCAM-1, CD234 (Winkler et al., 2010; Jacobsen et al., 2014; Dutta et al., 2015; Hur et al., 2016).

Третья популяция – остеомаки (периостальные макрофаги) – это макрофаги КМ, которые находятся на активных участках костеобразования на эндостальной и периостальной поверхностях, формируют непрерывный слой на границе эндоста и КМ и участвуют в гомеостазе и восстановлении костей (Pettit et al., 2008; Wu et al., 2013; Sinder et al., 2015). Остеомаки также являются неотъемлемой частью анаболического действия паратироидных гормонов и могут способствовать воздействию микробиоты на кости (Cho et al., 2014; Li et al., 2016). Этот тип макрофагов экспрессирует набор общих маркеров пан-макрофагов, включая F4/80, CD115, CD68 и Mac-3, но не экспрессирует маркер остеокластов тартрат-резистентную кислотную фосфатазу (TRAP5b) или мар-

керы линии остеобластов (Chang et al., 2008; Wu et al., 2013; Jacobsen et al., 2014; Sinder et al., 2015). До сих пор нет уникальных маркеров, отличающих остеомаки от других подмножеств костномозговых макрофагов.

Моноциты и макрофаги КМ, получая сигналы от микроокружения, могут дифференцироваться в 2 основных фенотипа с промежуточными формами: провоспалительный M1 и противовоспалительный M2. Для фенотипа M1 характерно наличие маркеров CD80, CD86 и продукция цитокинов IL-12, IL-18, IL-1 β , TNF α , NO, АФК, для фенотипа M2 – наличие маркеров CD206, CD36, CD163, CD301 и продукция IL-10, IL-13 и TGF- β (Сарбаева и др., 2016; Сумина и др., 2016).

Активация макрофагов не является жестко детерминированной и стабильной. При изменении спектра стимулирующих цитокинов возможна трансформация M1-фенотипа в M2. Макрофаги, поглощая апоптозные клетки, резко снижают секрецию и синтез медиаторов воспаления CCL2, CXCL2, CCL3, CXCL1, TNF-a, MG-CSF, IL-1b, IL-8 и многократно усиливают продукцию TGF-b. Возможна и обратная трансформация фенотипа: из M2 в M1 при развитии ожирения, сахарного диабета 1 типа и панкреатита. Многие авторы ставят под вопрос существование в организме двух четко различимых популяций макрофагов M1 и M2 (Сарбаева и др., 2016). Возможность репрограммирования макрофагов в патогенезе заболеваний позволяет поставить новые цели для коррекции нарушенного иммунного ответа и лечения различных заболеваний.

В связи с этим, представляется актуальным изучение клеточного ответа макрофагов в экспериментальных условиях, при их культивировании с веществом аминодигидрофталазиндионом натрия (АДФН). Это вещество присутствует в общедоступных базах данных, его идентификационный номер в базе PubChem: 9794222, InChI Key: JKEBMURXLKGPLR-UHFFFAOYSA-N, молекулярная формула: C₈H₆N₃NaO₂. В ряде работ было показано, что это соединение воздействует на функционально-метаболическую активность макрофагов, и обладает выраженным противовоспалительным и антиоксидантным действием (Jukić et al., 2011, 2012; Danilova et al., 2017, 2020). АДФН показал свою модулирующую активность на макрофаги в наших предыдущих исследованиях (Поздина и др., 2020). Было показано, что АДФН способствует инфильтрации M2-макрофагов в поджелудочную железу, в которой они воздействовали на β -клетки островков Лангерганса, что приводило к пролиферации β -клеток и снижению уровня глюкозы при моделировании сахарного диабета 1 типа (СД1) (Danilova et al., 2017). Также было показано, что

АДФН способствует миграции СГК в кровь и зону повреждения (Danilova et al., 2020).

В настоящей работе была поставлена цель изучить особенности функционирования популяции макрофагов из КМ в условиях *in vitro* и оценить клеточный ответ и изменение морфофункциональных параметров макрофагов, подвергшихся стимуляции АДФН, для последующей коррекции воспалительных реакций, возникающих в органах-мишенях при повреждении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали макрофаги КМ, полученные из интактных самок крыс Wistar в возрасте 3 мес. и весом 237 ± 9.12 г. Макрофаги культивировали в течение 24, 48 и 72 ч. Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№ 07/19 от 18.12.2019) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

Выделение макрофагов из КМ. Выведение животных из эксперимента проводили с помощью внутримышечного введения золетила в дозе 15 мг/кг (Virbac Sante Animale, Франция). Выделение макрофагов из КМ проводили по описанной методике (Madaan et al., 2014) с изолированием и очищением бедренной кости. Очищенную кость помещали в 70%-ный раствор этилового спирта на 5 мин, отрезали эпифизы с обоих концов. Кость промывали раствором HBSS (Биолот, Россия) до тех пор, пока полость кости не становилась белой. Суспензию собирали в стерильную пробирку для центрифугирования и доводили объем до 20 мл, используя HBSS (Биолот, Россия).

Получение макрофагальной культуры. Полученную суспензию клеток центрифугировали 8 мин при 300 об./мин. Осадок суспензировали в 20 мл HBSS (Биолот, Россия) для повторного центрифугирования. После процедуры получившийся клеточный осадок ресуспензировали в полной питательной среде (ППС) и вносили на покровные стекла в чашки Петри 2 мл суспензии. Для приготовления ППС использовали культуральную среду RPMI-1640 (90% от общего объема) (Биолот, Россия), эмбриональную телячью сыворотку FBS (Биолот, Россия) (10% от общего объема среды), и гентамицин в концентрации 10 мкг/мл. Далее культивировали в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония).

Стимуляция макрофагов АДФН. Полученную клеточную культуру клеток делили на две группы: нестимулированные макрофаги, которые являлись контролем, и стимулированные макрофаги, к которым через 24 ч культивирования добавляли АДФН в дозе 50, 100 мкг/мл. Клетки культивировали с веще-

ством в течение 24, 48 и 72 ч. По истечению сроков культивирования в присутствии АДФН покровные стекла с клетками фиксировали в чашках Петри 10%-ным раствором формалина в течение 5 мин.

Морфометрическая характеристика макрофагов. В качестве морфометрических показателей определяли площадь клетки, цитоплазмы и ядра в мкм², а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Визуализацию осуществляли с помощью оптического микроскопа Leica DM2500 (Leica, Германия) и подключенной к ней камеры Leica DFC420 (Leica, Германия). Для обработки изображений использовали программу LAS Core V4.9 (Leica, Германия).

Определение фенотипических маркеров макрофагов. Для определения фенотипа макрофагов клетки окрашивали иммуноцитохимически на поверхностные маркеры F4/80 и CD163 (MA5-16624 и MA5-16658 соответственно; ThermoFisher, США). Окраска на маркер F4/80 показывает дифференцировку клеток в макрофаги. Существует ряд статей, в которых утверждается, что этот маркер является рецептором классически активированных макрофагов (типа M1) (Kristiansen et al., 2001). Белок CD163 является поверхностным маркером макрофагов противовоспалительного M2-фенотипа (Schaer et al., 2006; Шарфутдинова и др., 2014). Количество маркеров F4/80⁺ и CD163⁺ на поверхности макрофагов оценивали по показателю оптической плотности (ОП) и выражали в процентах от общего количества клеток.

Анализ образования TGF-β в цитоплазме макрофагов. Клетки окрашивали иммуноцитохимически на TGF-β – многофункциональный цитокин, принадлежащий к суперсемейству трансформирующих факторов роста. TGF-β стимулирует созревание покоящихся моноцитов в макрофаги, а также подавляет выработку воспалительных цитокинов в моноцитах и макрофагах, вероятно, из-за ингибирования NF-κB (Bletriot et al., 2015). Содержание TGF-β⁺ макрофагов оценивали по оптической плотности окраски и выражали в усл. ед.

Определение пролиферативной активности макрофагов. Пролиферативную активность оценивали по иммуноцитохимической окраске ядерного белка Ki-67. Белок Ki-67 присутствует во всех активных фазах клеточного цикла (G₁, S, G₂ и M) и необходим для пролиферации клеток, но отсутствует в покоящихся клетках (в фазе G₀). По наличию и количеству Ki-67 можно оценивать пролиферативную активность клеток (Osterud, Bjorklid, 2003). Количество Ki-67⁺-макрофагов оценивали по оптической плотности и выражали в процентах от общего количества клеток.

Статистический анализ. Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA.10 и SPSS. Вычисляли среднее арифметическое, ошиб-

Таблица 1. Сравнительная морфометрическая характеристика макрофагов КМ в культуре, нестимулированных (контроль) и стимулированных АДФН (50 или 100 мкг/мл)

Время, ч	S клетки, мкм ²	S ядра, мкм ²	S цитоплазмы, мкм ²	ЯЦО
Контроль				
24	146.95 ± 14.68	33.89 ± 2.08	113.05 ± 13.19	0.59 ± 0.06
48	282.01 ± 20.23 ^а	37.49 ± 1.46 ^а	243.66 ± 19.11 ^а	0.32 ± 0.02 ^а
72	265.74 ± 36.19 ^а	46.51 ± 3.51 ^{а, б}	218.68 ± 36.04 ^а	0.38 ± 0.05 ^а
АДФН, 50 мкг/мл				
24	141.91 ± 11.01	33.93 ± 1.23	107.31 ± 10.03	0.63 ± 0.04
48	256.39 ± 12.73 ^{а, г}	35.38 ± 0.98	220.24 ± 12.19 ^{а, г}	0.31 ± 0.03 ^{а, г}
72	232.16 ± 14.21 ^{а, г}	34.85 ± 1.11 ^б	196.43 ± 13.29 ^{а, г}	0.35 ± 0.02 ^{а, г}
АДФН, 100 мкг/мл				
24	125.69 ± 6.41 ^д	28.22 ± 0.88 ^{г, д}	97.47 ± 6.08 ^д	0.47 ± 0.03 ^{г, д}
48	295.96 ± 31.70 ^{а, г, д, ж}	36.96 ± 2.57 ^ж	259.02 ± 30.53 ^{а, г, д, ж}	0.20 ± 0.02 ^{а, г, д, е, ж}
72	261.95 ± 37.50 ^{а, г, д, ж}	34.59 ± 1.77 ^б	226.70 ± 36.80 ^{а, г, д, ж}	0.27 ± 0.02 ^{а, г, д, е, ж}

Примечание. S – площадь. Приводятся средние значения по группам и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при $P \leq 0.05$ от группы: ^аКонтроль, 24 ч; ^бКонтроль, 48 ч; ^вКонтроль, 72 ч; ^гАДФН, 50 мкг/мл, 24 ч; ^дАДФН, 50 мкг/мл, 48 ч; ^еАДФН, 50 мкг/мл, 72 ч; ^жАДФН, 100 мкг/мл, 24 ч.

ку среднего и стандартное отклонение. Определяли достоверность различий между образцами клеток, принадлежащих к одной популяции (ранговый анализ Краскела–Уоллиса, медианный тест). Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическая и морфометрическая характеристика макрофагов костного мозга. Нестимулированная культура макрофагов КМ через 24 ч культивирования представлена клетками округлой формы с небольшим количеством цитоплазмы и округлым ядром, расположенным в центре клетки (рис. 1). Площадь ядра макрофагов увеличивается с увеличением срока культивирования следующим образом: 33.89 ± 2.08 мкм² (24 ч) → 37.49 ± 1.46 мкм² (48 ч) → 46.51 ± 3.51 мкм² (72 ч). Площадь цитоплазмы ($S_{\text{цит}}$) и, следовательно, площадь клетки ($S_{\text{кл}}$) максимально увеличиваются через 48 ч культивирования ($S_{\text{кл}} = 282.01 \pm 20.23$ мкм², $S_{\text{цит}} = 243.66 \pm 19.11$ мкм²) (табл. 1).

При 24-часовом культивировании в присутствии АДФН в любой из двух концентраций клетки выгля-

дят так же, как и в нестимулированной культуре: округлая форма клеток и округлое ядро, занимающее центральное положение, площадь которого составляет 33.93 ± 1.23 и 28.22 ± 0.88 мкм² при концентрации АДФН 50 и 100 мкг/мл соответственно. Площадь цитоплазмы небольшая и составляет 107.31 ± 10.03 и 97.47 ± 6.08 мкм² при концентрации АДФН 50 и 100 мкг/мл соответственно. К 48 ч культивирования в присутствии 50 или 100 мкг/мл АДФН клетки максимально увеличиваются в размере и почти не меняются впоследствии, меняется форма клеток и ядро смещается к периферии, появляются клетки дендритоподобной формы (рис. 1, табл. 1).

Характер изменения ЯЦО у стимулированных и нестимулированных макрофагов КМ с течением времени культивирования одинаков. В культуре макрофагов при 24- часовом культивировании ЯЦО имеет максимальное значение (0.59 ± 0.06 в контроле против 0.63 ± 0.04 и 0.47 ± 0.03 в присутствии 50 и 100 мкг/мл АДФН соответственно). К 48 ч культивирования за счет быстрого роста цитоплазмы макрофаги имеют минимальное значение ЯЦО (0.32 ± 0.02 в контроле против 0.31 ± 0.03 и 0.20 ± 0.02 в присутствии 50 и 100 мкг/мл АДФН соответственно). Через 72 ч ЯЦО стимулированных и нестимулированных

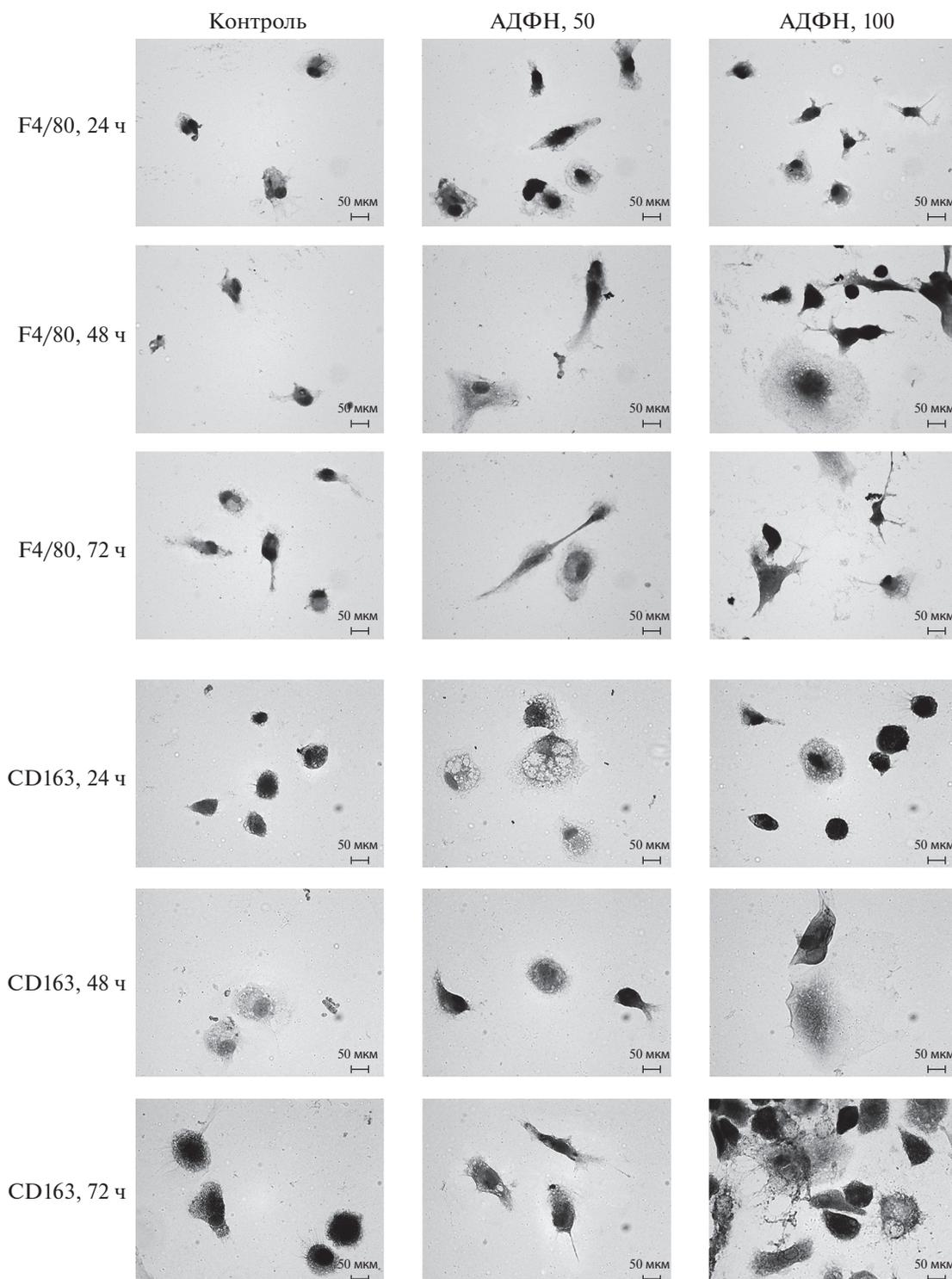


Рис. 1. Иммуноцитохимическая окраска на маркерные белки F4/80 и CD163 макрофагов костного мозга. Клетки делили на две больших группы: нестимулированные (контроль) и стимулированные макрофаги, в которые добавляли АДФН в дозе 50 мкг/мл (АДФН, 50) или 100 мкг/мл (АДФН, 100). Клетки культивировали с веществом в течение 24, 48 и 72 ч. Клетки фиксированы и подкрашены гематоксилином Эрлиха. Ув. об.: 100×.

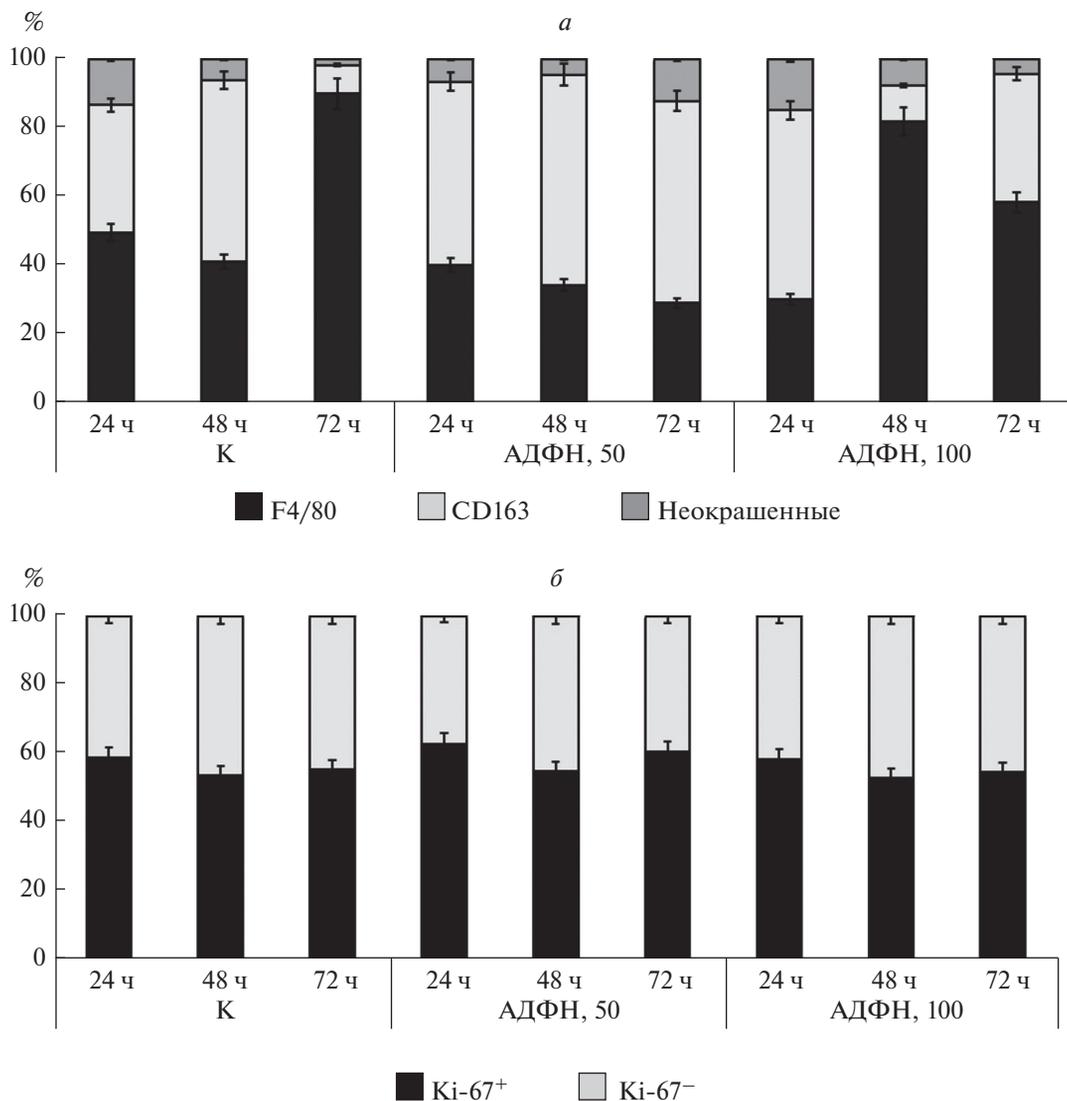


Рис. 2. Соотношение макрофагов Ki-67⁺ и Ki-67⁻ (а), а также F4/80⁺ и CD163⁺ (б) из костного мозга нестимулированных (контроль, К) и стимулированных АДФН в дозе 50 или 100 мкг/мл (АДФН, 50 и АДФН, 100 соответственно) в течение 24, 48 и 72 ч (б).

макрофагов увеличивается относительно показателя ЯЦО, измеренного через 48 ч (табл. 1).

Таким образом, для стимулированных и не стимулированных макрофагов КМ в культуре отмечается изменение морфометрических параметров с увеличением срока культивирования. При этом, в отличие от контроля, в культуре стимулированных макрофагов КМ к 48 часам культивирования в присутствии 50 или 100 мкг/мл АДФН появляются клетки дендритоподобной формы. В сравнении с дозой АДФН 50 мкг/мл доза 100 мкг/мл при 48-часовом культивировании способствует максимальному увеличению показателей площади цитоплазмы и площади клетки макрофагов КМ в культуре.

Характеристика пролиферативной активности макрофагов КМ. Был проведен анализ соотношения макрофагов Ki-67⁺ и Ki-67⁻. Белок Ki-67 является общепринятым стандартом для оценки пролиферативной активности клеток на каждой стадии клеточного цикла, кроме клеток находящихся в G₀-фазе. В группах макрофагов, нестимулированных и стимулированных АДФН, доля Ki-67⁺-клеток преобладает на всех сроках культивирования. В период 24-часового культивирования у стимулированных и нестимулированных макрофагов наблюдается самое высокое содержание Ki-67⁺-клеток. Дальнейшее культивирование способствует незначительному уменьшению доли макрофагов Ki-67⁺ во всех исследуемых группах (рис. 2б).

Таблица 2. Содержание маркеров F4/80 и CD163 макрофагов КМ контрольных и стимулированных АДФН в дозе 50 или 100 мкг/мл в течение 24, 48 и 72 ч

Время, ч	Контроль	АДФН, 50 мкг/мл	АДФН, 100 мкг/мл
F4/80, усл. ед (M1-фенотип)			
24	129.54 ± 8.50	126.91 ± 6.58	144.17 ± 5.49 ^{а, в}
48	134.67 ± 5.10	160.33 ± 7.25 ^{а, б, в, г}	149.76 ± 3.88 ^{а, б}
72	145.95 ± 3.87 ^а	142.07 ± 5.41	134.17 ± 4.58
CD163, усл. ед. (M2-фенотип)			
24	121.71 ± 3.81	134.24 ± 2.68 ^а	132.2 ± 1.85 ^а
48	129.25 ± 2.37	119.39 ± 1.87 ^{б, в}	115.74 ± 7.26 ^{б, в, д}
72	120.74 ± 5.51	114.69 ± 2.00 ^{б, в}	129.34 ± 2.93 ^г

Примечание. Содержание маркера определяли по показателю оптической плотности иммуноцитохимической окраски. Приводятся средние значения и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при $P \leq 0.05$ от группы: ^аКонтроль, 24 ч; ^бКонтроль, 48 ч; ^вАДФН, 50 мкг/мл, 24 ч; ^гАДФН, 50 мкг/мл 72 ч; ^дАДФН, 100 мкг/мл 24 ч.

Тем не менее, была отмечена следующая тенденция: при воздействии на клетки 50 мкг/мл АДФН доля Ki-67⁺-макрофагов была больше в сравнении с группами нестимулированных макрофагов и макрофагов, культивированных с АДФН в дозе 100 мкг/мл.

Фенотипическая характеристика макрофагов КМ. На рис. 2а представлено соотношение макрофагов F4/80⁺ (M1-фенотип) и CD163⁺ (M2-фенотип) контрольных и стимулированных АДФН в разные сроки культивирования. У нестимулированных макрофагов в течение 24 и 48 ч культивирования нет преобладания какого-либо определенного фенотипа макрофагов. К 72 ч наблюдается тенденция к преобладанию в культуре макрофагов F4/80⁺.

При воздействии на макрофаги 50 мкг/мл АДФН с увеличением срока культивирования происходит увеличение доли CD163⁺-клеток в культуре. АДФН в дозе 100 мкг/мл, наоборот, способствует увеличению доли F4/80⁺-макрофагов.

Содержание макрофагов F4/80⁺ и CD163⁺ оценивали по показателю оптической плотности (ОП) иммуноцитохимической реакции. У нестимулированных макрофагов с увеличением срока культивирования отмечается усиление окраски на маркер F4/80. При 48-часовом культивировании макрофагов с АДФН в дозе 50 мкг/мл окраска на маркер F4/80 наиболее интенсивна (160.33 ± 7.25 усл. ед.) в сравнении с 24 (126.91 ± 6.58 усл. ед.) и 72 (142.07 ± 5.41 усл. ед.) часами культивирования. Окрашивание на F4/80 также усиливается при воздействии на клетки 100 мкг/мл АДФН на сроках культивирования с веществом 24 и 48 ч. Содержание маркера CD163 при стимуляции

макрофагов 50 и 100 мкг/мл АДФН повышено при 24-часовом воздействии вещества на культуру (134.24 ± 2.68 и 132.2 ± 1.85 усл. ед. соответственно) по сравнению с нестимулированным контролем (121.71 ± 3.81 усл. ед.) (табл. 2).

Характеристика образования TGF-β в цитоплазме макрофагов. Клетки окрашивали иммуноцитохимически на наличие в цитоплазме TGF-β. Интенсивность окраски TGF-β у нестимулированных макрофагов уменьшается к 72 ч культивирования. Окраска на цитокин TGF-β становится более интенсивной к 48 ч культивирования клеток в присутствии 50 мкг/мл

Таблица 3. Содержание TGF-β в цитоплазме макрофагов КМ, культивированных в отсутствие (контроль) и в присутствии 50 или 100 мкг/мл АДФН в течение 24, 48 и 72 ч

Время, ч	TGF-β, усл. ед.		
	Контроль	АДФН, 50 мкг/мл	АДФН, 100 мкг/мл
24	136.06 ± 1.91	125.21 ± 1.11 ^а	141.72 ± 1.33 ^а
48	147.72 ± 1.31 ^а	152.30 ± 1.37 ^{а, б}	153.20 ± 1.55 ^{а, в}
72	113.10 ± 1.97 ^{а, б}	140.15 ± 1.47 ^б	134.02 ± 1.75 ^в

Примечание. Содержание маркера определяли по показателю оптической плотности иммуноцитохимической окраски. Приводятся средние значения и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при $P \leq 0.05$ от группы: ^аКонтроль, 24 ч; ^бАДФН, 50 мкг/мл, 24 ч; ^вАДФН, 100 мкг/мл 24 ч.

АДФН, и ее интенсивность сохраняется в течение 72 ч. АДФН в дозе 100 мкг/мл усиливает окраску TGF- β к 48 ч, и уменьшает ее к 72 ч культивирования клеток с веществом (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Макрофаги – клетки иммунной системы, обладающие активной подвижностью, адгезивностью и выраженной способностью к фагоцитозу. В норме эти клетки отвечают за поддержание гомеостаза в различных периферических тканях (дерма, кость, легкие, селезенка, жировая ткань и пр.) путем удаления апоптических клеток и синтеза широкого спектра цитокинов. В случае возникновения патологических состояний происходит истощение макрофагов в месте локализации воспаления и восстановление пула этих клеток идет из моноцитов КМ, которые дифференцируются из кроветворной клетки-предшественника (Davies et al., 2013; Bonnarde, Williams, 2018).

В настоящее время известно, что макрофаги КМ не однородны, что выражается в большом разнообразии высвобождаемых цитокинов, маркеров клеточной поверхности и транскрипционных профилей. Также, макрофаги КМ выполняют ряд уникальных функций, связанных с процессом кроветворения: участвуют в выживании эритробластов во время их созревания, поддерживают гомеостаз гематопозитических стволовых клеток. Тканевые сигналы, сигналы нейроэндокринной системы, энергетический статус, а также сигналы, связанные с патогеном, являются потенциальными факторами, которые способны контролировать активацию макрофагов (Nagareddy et al., 2014; Röszer, 2018).

Можно предположить, как и у макрофагов любых других органов, фенотип макрофагов КМ будет меняться в зависимости от повреждающего фактора. Это может оказывать существенное влияние на интенсивность кроветворения. Участие макрофагов в восстановительном росте тканей и процессах кроветворения, делает эти клетки потенциальными мишенями для терапии при повреждении. В связи с этим, возможность репрограммирования макрофагов КМ в патогенезе заболеваний является перспективной стратегией в терапии этих заболеваний, что и определило основные цели и задачи данной работы.

В настоящей работе рассматривали ответ популяции костномозговых макрофагов в условиях *in vitro* подвергшихся стимуляции АДФН. В ряде исследований *in vivo* было показано, что соединение регулирует функционально-метаболическую активность макрофагов, ингибируя обратимо на 10–12 ч избыточную продукцию TNF- α , IL-1 и других провоспалительных факторов, а также повышая продукцию TGF- β и IL-10 при регенерации поврежденных ор-

ганов (Jukić et al., 2011, 2012; Danilova et al., 2017, 2020; Поздина и др., 2020).

В отличие от зрелых тканевых макрофагов, выделенных из других органов, в культуре макрофагов КМ экспрессия маркеров F4/80 и CD163 и также окончательная дифференциация клеток происходит к 48 ч культивирования (Поздина и др., 2020). В процессе роста у нестимулированных макрофагов нет преобладания какого-либо определенного фенотипа. Через 72 ч культивирования макрофаги КМ в большинстве своем становятся преимущественно провоспалительными (M1). Это означает, что для незрелых макрофагов КМ не характерно преобладание какого-либо одного фенотипа, а зрелые макрофаги КМ в подавляющем большинстве являются провоспалительными (M1) клетками, функцией которых является фагоцитирование клеточного дебриса и участие в клеточном ответе на воспалительные реакции организма. С увеличением срока культивирования у нестимулированных макрофагов отмечается понижение содержания TGF- β .

АДФН обладает выраженным дозозависимым действием на макрофаги КМ. Стимуляция макрофагов АДФН в дозе 50 мкг/мл способствует росту количества CD163⁺-клеток и содержания этого маркера с увеличением срока культивирования. Действие 100 мкг/мл АДФН, наоборот, с увеличением времени культивирования приводит к повышению доли F4/80⁺-клеток в культуре и росту содержания этого маркера. При воздействии АДФН (50 и 100 мкг/мл) содержание TGF- β достигает максимального значения к 48 ч культивирования клеток с веществом. При добавлении АДФН в культуру моноцитов ускоряется созревание макрофагов.

Ранее было показано, что АДФН в резидентных макрофагах способствует изменению профиля секретируемых цитокинов, при этом изменения количества поверхностных фенотипических маркеров не происходило (Поздина и др., 2020). В отличие от резидентных макрофагов, макрофаги КМ обладают более выраженным ответом на вещество, который приводит к поляризации макрофагов и появлению фенотипа M1 или M2. Однако имеющихся данных недостаточно. В следующей работе мы планируем оценить секрецию цитокинов для однозначного утвердительного ответа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной программы “Изучение механизмов регенераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм” (Гос. регистрация № АААА-А18-118020590107-0).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№ d-ТМ-2016-20) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Данилова И.Г., Емельянов В.В., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Булавинцева Т.С., Черешнева М.В., Сидорова Л.П., Черешнев В.А., Соколова К.В. 2018. Цитокиновая регуляция регенераторных процессов в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном диабете у крыс и его коррекция соединением ряда 1,3,4-тиадиазина и липоевой кислотой. Мед. Иммунол. Т. 20. № 1. С. 35. (Danilova I.G., Emelianov V.V., Gette I.F., Medvedeva S.Yu., Bulavintseva T.S., Cheresheva M.V., Sidorova L.P., Chereshev V.A., Sokolova K.V. 2018. Cytokine regulation of regenerative processes in pancreatic gland in alloxan-induced diabetic rats, and its correction by 1,3,4-thiadiazine composition and lipoic acid. Med. Immunol. (Russia). V. 20. № 1. P. 35.)
- Поздина В.А., Данилова И.Г., Абидов М.Т. 2020а. Иммунофенотипические особенности альвеолярных макрофагов и макрофагов селезенки животных с моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro*. Рос. иммунол. журн. Т. 23. № 2. С. 145. (Pozdina V.A., Danilova I.G., Abidov M.T. 2020a. Immunophenotypical aspects of lung and spleen macrophages derived animals with the model of alloxan diabetes (type I) and their correction by sodium aminodiglydrophthalazindione *in vitro*. Russian J. Immunology. V. 23. № 2. P. 145.)
- Поздина В.А., Данилова И.Г., Абидов М.Т. 2020б. Иммунофенотипические особенности макрофагов печени и перитонеальной области животных с моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro*. Цитология. Т. 62. № 8. С. 581. (Pozdina V.A., Danilova I.G., Abidov M.T. 2020b. Immunophenotypical aspects of peritoneal and liver macrophages derived animals with the model of alloxan diabetes (type I) and their correction by sodium aminodiglydrophthalazindione *in vitro*. Tsitologiya. V. 62. № 8. P. 581.)
- Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милыкова М.Н. 2016. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. Гены и клетки. Т. 11. № 1. С. 9. (Sarbaeva N.N., Ponomareva J.V., Milyakova M.N. 2016. Macrophages: diversity of phenotypes and functions, interaction with foreign materials. Genes & Cells. V. 11. № 1. P. 9.)
- Сумина В.П., Гагиева А.В., Диденко М.И. 2016. Репрограммирование клеточных ответов макрофагов: возможности управления воспалительным процессом. Журн. науч. ст. "Здор. и обр. в 21 веке" Т. 18. № 3. С. 92. (Sumina V.P., Gagieva A.V., Didenko M.I. 2016. A review of the control of the immune response: reprogramming of macrophages as a promising direction of pathophysiology. The Jour. of sci. artc. "Health and Educ. Mil.". 2016. V. 18. № 3. P. 92.)
- Шарафутдинова Л.А., Горшкова Е.Н., Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р., Башкатов С.А. 2014. Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C60. Биомедицина. № 3. С. 49. (Sharafutdinova E.N., Gorshkova I.I., Sadrtinova Z.R., Khismatulina S.A. 2014. Evaluation of the morphological parameters of neutrophilic granulocytes by atomic force microscopy after exposure to fullerene C60. Biomed. (Russ.) V. 3. P. 49–53.)
- Blériot C., Dupuis T., Jouvion G., Eberl G., Disson O., Lecuit M. 2015. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. Immunity. V. 42. № 1. P. 145.
- Bonnardel J., Williams M. 2018. Developmental control of macrophage function. Curr. Opin. Immunol. V. 50. P. 64.
- Chang M.K., Raggatt L.-J., Alexander K.A., Kuliwaba J.S., Fazlali N.L., Schroder K., Maylin E.R., Ripoll V.M., Hume D.A., Pettit A.R. 2008. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function *in vitro* and *in vivo*. J. Immunol. V. 181. P. 1232.
- Cho Sun Wook, Soki Fabiana N., Koh Amy J., Eber Matthew R., Entezami Payam, Park Serk In, van Rooijen Nico, McCauley Laurie K. 2014. Osteal macrophages support physiologic skeletal remodeling and anabolic actions of parathyroid hormone in bone. PNAS. V. 111. P. 1545.
- Chow A., Lucas D., Hidalgo A., Méndez-Ferrer S., Hashimoto D., Scheiermann C., Battista M., Leboeuf M., Prophete C., Van Rooijen N., Tanaka M., Merad M., Frenette P.S. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. J. Exp. Med. V. 208. P. 261.
- Christopher M.J., Rao M., Liu F., Woloszynek J.R., Link D.C. 2011. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. J. Exp. Med. V. 208 P. 251.
- Danilova I.G., Bulavintseva T.S., Gette I.F., Medvedeva S.Y. 2017. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. Biomed. Pharmacother. V. 95. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.117>
- Danilova I.G., Shafigullina Z.A., Gette I.F., Sencov V.G., Medvedeva S.Y., Abidov M.T. 2020. Accelerated liver recovery after acute CCl4 poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide. Int. Immunopharmacol. V. 80. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106124>
- Davies L.C., Rosas M., Jenkins S.J., Liao C.T., Scurr M.J., Brombacher F., Fraser D.J., Allen J.E., Jones S.A., Taylor P.R. 2013. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. Nat. Commun. V. 4. P. 1886.
- Dutta P., Hoyer F.F., Grigoryeva L.S., Sager H.B., Leuschner F., Courties G., Borodovsky A., Novobrantseva T., Ruda V.M., Fitzgerald K., Iwamoto Y., Wojtkiewicz G., Sun Y., Da Silva N., Libby P. et al. 2015. Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. J. Exp. Med. V. 212. P. 497.

- Hur J., Choi J.I., Lee H., Nham P., Kim T.W., Chae C.W., Yun J.Y., Kang J.A., Kang J.H., Lee S.E., Yoon C.H., Boo K.J., Ham S.J., Roh T.Y., Jun J.K. et al. 2016. CD82/KAI1 maintains the dormancy of long-term hematopoietic stem cells through interaction with DARC-expressing macrophages. *Cell Stem Cell*. V. 18. P. 508.
- Jacobsen R.N., Forristal C.E., Raggatt L.J., Nowlan B., Barbier V., Kaur S., Van Rooijen N., Winkler I.G., Pettit A.R., Levesque J.P. 2014. Mobilization with granulocyte colony-stimulating factor blocks medullary erythropoiesis by depleting F4/80(+)VCAM1(+)CD169(+)ER-HR3(+)Ly6G(+)erythroid island macrophages in the mouse. *Exp. Hematol*. V. 42. P. 547.
- Jukić T., Abidov M., Ihan A. 2011. A tetrahydrophthalazine derivative 'sodium nucleinate' exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells in vitro and in vivo. *Collegium Antropol.* V. 35. P. 1219.
- Jukić T., Ihan A., Jukić D. 2012. Tetrahydrophthalazine derivative "sodium nucleinate" exert its anti-inflammatory effects through inhibition of oxidative burst in human monocytes. *Collegium Antropol.* V. 36. P. 409.
- Kawane K., Fukuyama H., Kondoh G., Takeda J., Ohsawa Y., Uchiyama Y., Nagata S. 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*. V. 292. P. 1546–1549.
- Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. V. 409. P. 198.
- Li J.Y., Chassaing B., Tyagi A.M., Vaccaro C., Luo T., Adams J. 2016. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *J. Clin. Invest.* V. 126. P. 2049–2063.
- Liu M., Jin X., He X., Pan L., Zhang X., Zhao Y. 2015. Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS One*. V. 10. e0121921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121921>
- Madaan A., Verma R., Singh A.T., Jain S.K., Jaggi M. 2014. A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J. Biol. Methods*. V. 1. P. 1.
- Nagareddy P.R., Kraakman M., Masters S.L., Stirzaker R.A., Gorman D.J., Grant R.W., Dragoljevic D., Hong E.S., Abdel-Latif A., Smyth S.S., Choi S.H., Korner J., Bornfeldt K.E., Fisher E.A., Dixit V.D. et al. 2014. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab*. V. 19. P. 821.
- Osterud B., Bjorklid E. 2003. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol. Rev.* V. 83. P. 1069.
- Pettit A.R., Chang M.K., Hume D.A., Raggatt L.J. 2008. Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. V. 43. P. 976.
- Röszer T. 2018. Understanding the biology of self-renewing macrophages. *Cells*. V. 7. P. 103.
- Schaer D.J., Schaer C.A., Buehler P.W., Boykins R.A., Schoedon G., Alayash A.I., Schaffner A. 2006. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*. V. 107. P. 373.
- Sinder B.P., Pettit A.R., McCauley L.K. 2015. Macrophages: their emerging roles in bone. *J. Bone Miner. Res.* V. 30. P. 2140.
- Sonoda Y., Sasaki K. 2008. Surface morphology of the central macrophages of erythroblastic islets in the spleen of aged and pregnant mice: an immunohistochemical light microscopic study. *Arch. Histol. Cytol.* V. 71. P. 155.
- Toda S., Segawa K., Nagata S. 2014. MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. *Blood*. V. 123. P. 3963.
- Tonkin J., Temmerman L., Sampson R.D., Gallego-Colon E., Barberi L., Bilbao D., Schneider M.D., Musaro A., Rosenthal N. 2015. Monocyte/macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration and modulates autocrine polarization. *Mol. Ther.* V. 23. P. 1189.
- Ulyanova T., Jiang Y., Padilla S., Nakamoto B., Papayannopoulou T. 2011. Combinatorial and distinct roles of alpha(5) and alpha(4) integrins in stress erythropoiesis in mice. *Blood*. V. 117. P. 975.
- Winkler I.G., Sims N.A., Pettit A.R., Barbier V., Nowlan B., Helwani F., Poulton I.J., Van Rooijen N., Alexander K.A., Raggatt L.J., Levesque J.P. et al. 2010. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSC. *Blood*. V. 116. I. 23. P. 4815.
- Wu A.C., Raggatt L.J., Alexander K.A., Pettit A.R. 2013. Unraveling macrophage contributions to bone repair. *Bonekey Rep.* V. 2. P. 373.
- Wu A.C., He Y., Broomfield A., Paatan N.J., Harrington B.S., Tseng H.W., Beaven E.A., Kiernan D.M., Swindle P., Clubb A.B., Levesque J.P., Winkler I.G., Ling M.T., Srinivasan B., Hooper J.D. et al. 2016. CD169(+) macrophages mediate pathological formation of woven bone in skeletal lesions of prostate cancer. *J. Pathol.* V. 239. P. 218.

Immunophenotypic and Morphometric Evaluation of Bone Marrow Macrophages Culture Stimulated with Sodium Aminodihydrophthalazinedione *In Vitro*

V. A. Pozdina^{a,*}, U. V. Zvedenina^b, M. V. Ulitko^{c,d}, I. G. Danilova^{a,d}, and M. T. Abidov^e

^a Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620049 Russia

^b Ural State Medical University, Yekaterinburg, 620028 Russia

^c Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, 620026 Russia

^d Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, 620026 Russia

^e Institute of Immunology and Preventive Medicine, Ljubljana, 1000 Slovenia

*e-mail: varvara.pozdina@gmail.com

Morphometrical and immunophenotypical characteristics of macrophage cell cultures obtained from rats bone marrow were evaluated. Obtained cell cultures were stimulated with macrophages activator aminodihydrophthalazine-

dione (ADPN) *in vitro* for 24, 48 and 72-hour. Cells, nucleus, cytoplasm area were measured and nuclear cytoplasmic ratio (NCR) were calculated. Proliferative activity was assessed by the presence of the Ki-67 protein. The phenotype of macrophages was determined by the expression of the CD163 and F4/80 receptors. The content of the growth factor TGF- β in the cytoplasm of macrophages was estimated. Stimulation of macrophages by 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN promoted an increase in the number of CD163⁺ cells and content of this marker with an increase of cultivation time. On the contrary, the action of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN leads to an increase in the proportion of F4/80⁺ cells in the culture and to an increase of the marker content with an increase of cultivation time. The accumulation of TGF- β occurs during 48 h of cell cultivation under the action of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN. Increased amounts of the factor persist for 72 hours. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN enhanced the formation of TGF- β within 48 h, and inhibited it in 72 h in the presence of the substance. When ADPN is added to the culture of monocytes, the maturation of macrophages is accelerated. Moreover, the substance also has a pronounced dose-dependent effect on bone marrow macrophages.

Keywords: macrophages, bone marrow, sodium aminodihydrophthalazinedione

МОРФОГЕНЕЗ ОСТЕОИДНЫХ СТРУКТУР ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ФИБРИЛЛЯРНОМ КОЛЛАГЕНЕ В ПРИСУТСТВИИ СИЛИКОАЛЮМОФОСФАТА

© 2021 г. А. А. Гайдаш^{1, *}, М. И. Блинова², С. А. Александрова², Ю. А. Нашекина², В. К. Крутько¹, О. Н. Мусская¹, К. В. Скроцкая³, А. В. Нашекин⁴, Н. А. Михайлова², А. И. Кулак¹

¹Институт общей и неорганической химии НАН Белоруссии, Минск, 220072 Белоруссия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220006 Белоруссия

⁴Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 194021 Россия

*E-mail: aljack880@gmail.com

Поступила в редакцию 01.06.2021 г.

После доработки 22.06.2021 г.

Принята к публикации 01.07.2021 г.

Изучено влияние стеклокристаллического материала “Биосит-Ср Элкор” на ранние стадии морфогенеза остеоидных структур в культурах мезенхимных стромальных клеток костного мозга. Максимальный срок культивирования 28 сут. Морфологические исследования выполнены с применением сканирующей электронной микроскопии. Установлено, что силикоалюмофосфат ускоряет образование остеоидных структур, усиливает синтез, компактизацию и минерализацию фибриллярного коллагена, активизирует матриксные везикулы путем гиперплазии, гипертрофии и экскреции. В ходе культивирования стеклокристаллический материал частично растворяется и распадается, в питательную среду выходят химические агенты, обладающие сшивающими, поверхностно-активными и минерализующими свойствами. За счет действия поверхностно-активных агентов компактизированные коллагеновые волокна расправляются и перфорируются с формированием гаверсифицированных пластинчатых структур — структурных предшественников костных пластинок. Минерализующее действие опосредуется усилением гомо- и гетерогенной нуклеации кальцийфосфатов, отложением минеральных конкреций в дифференцирующихся клетках и в волокнах коллагеновой подложки, что ускоряет инволюцию клеточной культуры. Сделано заключение, что стеклокристаллический материал Биосит-Ср Элкор оказывает стимулирующее влияние на ранние стадии остеогенеза в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки костного мозга, коллаген I типа, силикоалюмофосфаты, остеогенез, матричные везикулы, минерализация, кальцийфосфаты, костные пластинки

DOI: 10.31857/S0041377121050047

Морфогенез органотипических структур в условиях *in vitro* и, безусловно, *in vivo* — явление трехмерное, что предполагает соответствующие аналитические 3D-подходы. Тем не менее, классические способы культивирования дифференцирующихся стволовых клеток основаны на применении двумерных моделей, преимущества которых хорошо известны. Прежде всего, это быстрая и относительно простая экспериментальная проверка результатов,

построенных на анализе прижизненных или фиксированных клеточно-тканевых материалов (Nelson, Bissell, 2006). Благодаря этому достигнуто немало. Но оно же затмило главный недостаток методологий 2D-подходов — морфогенез рассматривается исключительно в плоскостях горизонтальной направленности, а структуры в ортогональных проекциях недоступны. Недостаток в определенной мере компенсируют сканирующей зондовой технологией (сканирующая электронная, атомно-силовая, туннельная микроскопия), расширяющей инструментальный континуум и позволяющей изучать трехмерные интерфейсы с высоким пространственным разрешением. Особенно полезны подобные методики (в частности, сканирующая электронная микроскопия) при исследовании морфогенетических последствий влияния тех

Принятые сокращения: АКФ — аморфизированный кальцийфосфат; ГА — гидроксипатит; ГС — гранулы стеклокристаллического материала “Биосит-Ср Элкор”; КФ — кальцийфосфат; МВ — матриксные везикулы; МСК-КМ — мезенхимные стромальные клетки костного мозга; ОКФ — октакальцийфосфат; САПО — силикоалюмофосфаты; СЭМ — сканирующая электронная микроскопия; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

химических агентов, которые по своей природе образуют трехмерные связи.

Применительно к кремнию речь идет о силиконовых связях ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$), формирующих устойчивые 3D-конфигурации. Именно трехмерные надмолекулярные конструкции могут оказаться морфогенетическим стартапом, детальный анализ которого в парадигме 2D-подходов явно ограничен. Одними из источников силиконовых связей являются природные и синтетические силикоалюмофосфаты (САПО) – микропористые твердые вещества с различным соотношением $\text{SiO}_2 : \text{Al}_2\text{O}_3 : \text{P}_2\text{O}_5$. Синтетические САПО обладают технологически привлекательными свойствами: механической прочностью, термостойкостью, а также селективной каталитической активностью (Lok et al., 1984; Sinha et al., 1997; Fajdala, Tilley, 2001; Akhtar et al., 2014; Peng et al., 2018). Известны различные варианты $(\text{Al}_x\text{P}_y\text{Si}_z)\text{O}_2$: САПО-11, САПО-18, САПО-34, САПО-34/18, САПО-39, САПО-40 и др., отличающиеся соотношением $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ (Li et al., 2019; Knyazeva et al., 2019; Wang et al., 2019).

Все разновидности САПО имеют структуру специфически расположенных брэнстедовских кислотных центров, позволяющих использовать их для проведения направленных химических реакций. Биосилалы – аморфные стеклокристаллические материалы, при растворении которых возникают фазовые неоднородности. Так, в жидких биомиметической среде (сыворотке крови) САПО постепенно растворяются без осаждения. При этом изменяется структура решетки стекла, в которую входят гидроксильные ионы, а в ходе выщелачивания высвобождаются кремний, кальций и фосфор (Nikolić et al., 2017; Arifova et al., 2020).

Хорошо известно, что это остеотропные химические элементы, которые повышают плотность костной ткани и сдерживают ее резорбцию при остеопении, спровоцированной геохимическими или патофизиологическими факторами (Bae et al., 2008; Laguelle et al., 2009; Kim et al., 2009; Vu et al., 2015; Rodella et al., 2014). Остеостимулирующие эффекты являются базовыми и хорошо изучены на популяционном и организменном уровнях. Что же касается клеточных механизмов, проявляющихся на ранних стадиях, то сведений об этом недостаточно. В этом смысле первичные культуры дифференцирующихся стволовых клеток являются подходящей моделью для изучения остеогенеза на ранних стадиях.

Цель работы – определить характер влияния силикоалюмофосфата на морфогенез остеоидных структур при культивировании мезенхимных стромальных клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Культуру диплоидных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) получали из костного мозга конечностей новорожденного

кролика породы Шиншилла по стандартному методу (Николаенко, 2008). Для получения необходимого количества клетки культивировали в питательной (ростовой) среде следующего состава – α MEM (Sigma, США), 10% сыворотки эмбрионов коров (HyClone, США), 1% раствора антибиотиков Pen Strep (Sigma, США), 1% раствора глутамина Ultraglutamine (Lonza, Belgium). При пересеве открепление клеток осуществляли с помощью 0.25%-ного раствора трипсина в этилендиаминтетрауксусной кислоте (Invitrogen, Великобритания). Пассирование выполняли каждые 5–7 сут по достижении клетками субконфлюентного монослоя в культуральных флаконах площадью 25 и 75 см² (TPP, Швейцария). Клетки открепляли и пересевали в чашки Петри Tissue Culture Flask (TPP, Швейцария) диаметром 34 мм.

Варианты экспериментов: 1) контроль – стандартное культивирование клеток; 2) культивирование на подложке из коллагена I типа; 3) культивирование в присутствии гранул стеклокристаллического материала “Биосит-Ср Элкор” (ГС); 4) культивирование с использованием коллагена I типа и ГС. Культивирование проводили в ростовой и дифференцировочной (остеогенной) средах StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США) при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂.

Получение коллагена I типа. Коллаген получен из паравертбральных хвостовых сухожилий крыс породы Вистар методом кислотной экстракции, который обеспечивает сохранение концевых телопептидов (Кухарева и др., 2003). Раствор коллагена приготовлен в следующей последовательности. Первичные образцы сухожильных нитей выводили из хвостов, промывали 0.9%-ным раствором NaCl и проводили экстракцию в 0.5 М CH₃COOH. Полученный после экстракции материал осаждали, доводили концентрацию NaCl до 0.9 М; центрифугировали и диализовали против воды с последующей заменой на 0.1 М раствор уксусной кислоты. После диализа полученный раствор доводили до содержания уксусной кислоты 0.5 М. Далее проводили фосфатное осаждение: диализ против 0.5 М Na₂HPO₄ в течение 2 сут, затем заменяли раствор на 0.02 М Na₂HPO₄, эту процедуру повторяли еще три раза. Новый осадок разбавляли 0.5 М уксусной кислотой. Далее стерилизовали коллаген путем диализа в 0.5 М уксусной кислоте с хлороформом с последующей сменой раствора на 0.1, 0.001 М раствор уксусной кислоты. В течение следующих 4 сут меняли 0.001 М раствор уксусной кислоты еще 2 раза. В итоге получали концентрированный раствор коллагена I типа, который разводили в 0.001%-ном растворе уксусной кислоты до концентрации 100 мкг/мл (Швед и др., 2007). Белок в конечной концентрации наносили на внутреннюю поверхность культуральных сосудов или ГС, оставляли на 30 мин при 37°C. В результате такого способа нанесения на поверхностях формировался тонкий слой белка в молекулярной форме (Швед и др.,

2007). После этого убирали не связавшийся с поверхностью белок, промывая фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и ростовой средой.

Стеклокристаллический материал “Биосит-Ср Элкор” (ГС). Материал разработан в ООО НПФ “Элкор” (Санкт-Петербург). Диаметр зернения ГС составлял 1–0.3 мм. В состав ГС входят (мас. %): 26.0–33.4 SiO₂; 10.5–13.5 P₂O₅; 4.3–5.5 Al₂O₃; 23.6–30.4 CaO; 2.1–2.7 MgO; 3.5–4.5 ZnO, а также 30 об. % даллита. Общая пористость ГС составляет 60% (Елагина и др., 1999). Непосредственно перед использованием ГС дважды промывали полной ростовой средой с содержанием СЭК 10%.

На все варианты экспериментальных поверхностей высевали МСК-КМ в ростовую среду с разной плотностью: 21.7 тыс. кл./см² для культивирования в течение 3 и 7 сут, 5.4 тыс. кл./см² для культивирования в течение 14 сут и 2.7 тыс. кл./см² (для культивирования в течение 21 и 28 сут. После прикрепления клеток к подложке в половине лунок заменяли среду на дифференцировочную. Клетки культивировали в течение указанных сроков, меняя соответствующую среду два раза в неделю.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Для СЭМ образцы освобождали от питательной среды, промывали PBS и деионизованной водой. Затем фиксировали в растворе глутарового альдегида на PBS по схеме: 0.5%-ный раствор – 15 мин, 1%-ный – 30 мин, 2%-ный – 45 мин. Обезвоживали в растворах этанола в деионизованной воде восходящей концентрации по схеме: 10, 30, 45, 60, 70% – по 15 мин, 80% – 10 мин, 90% – 5 мин, 96% – 2 мин. Фиксированные образцы напыляли золотом в вакуумной установке K550X (Emitech, Англия) и изучали на растровых электронных микроскопах JSM-7001F (Jeol, Япония) и LEO 1420 (Carl Zeiss, Германия). Презентативность результатов обеспечивали 2–3 повторами каждой серии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании МСК-КМ совместно с экзогенным коллагеном и ГС в дифференцировочной среде формируется структурно неоднородная волоконная подложка, состоящая из рыхлой и плотной частей. В рыхлой части коллагеновая подложка трансформируется в ячеистую структуру с множественными сообщающимися отверстиями, сплетенными коллагеновыми волокнами, утолщающимися в узлах и покрывающими делящиеся клетки (рис. 1а). В плотной части коллагеновые субфибриллы организованы в многослойную пористую пленку (рис. 1б). Размеры пор варьируют в пределах от 50 нм до 1.5 мкм. Форма пор аппроксимируется ближе к эллипсоидам с хаотично ориентированными длинными осями (рис. 1в), свидетельствующая о действии разнонаправленных сил растягивания, возможно, в связи с ростом поверхностного натяжения жидкой

фазы. По мере увеличения сроков культивирования подложка дезорганизуется, сетчатые структуры распадаются (рис. 1г), пластинчатые структуры разрыхляются и частично отслаиваются (рис. 1д), коллагеновые волокна утолщаются, скручиваются, сморщиваются (рис. 1е).

В ходе культивирования коллагеновая подложка активно взаимодействует с ГС, также подвергающиеся закономерной трансформации. Частицы исходных образцов ГС имеют структуру склеенных полигональных линз (рис. 2а). По данным энергодисперсионного анализа в их состав входят (мас. %): О (31.0), Са (23.0), Si (13.0), Р (3.0), Al (2.5). В течение 3 сут культивирование ГС покрываются минерально-органической пленкой – пористой (рис. 2б) или плотной (рис. 2в). От пленок отходят короткие тонкие спайки, прикрепляющие ГС к подлежащим структурам (рис. 2г) и удерживающие их в фиксированном состоянии в условиях достаточно продолжительного культивирования (до 28 сут).

Пористая структура ГС в какой-то мере сходна со структурой функционализированных мезопористых кремнеземов с расширенными порами, используемых в близких экспериментальных условиях для доставки полимерных и жидкоподобных биомиметических предшественников аморфизированных кальцийфосфатов (АКФ) со стимуляцией внутрифибрилярной минерализации коллагена (Luo et al., 2016; Wei et al., 2020). В питательных средах (в равной мере в ростовой и дифференцировочной) мезопористость ГС проявляет структурную нестабильность – гранулы пронизываются множественными широкими каналами (рис. 2д). Гранулы в нейтральном или слабощелочном растворах питательных сред беспорядочно расклеиваются, крошатся, фрагментируются по линиям спекания с высвобождением остроугольных кварцеподобных линз (рис. 2е), несомненно, увеличивающих риски повреждения клеток.

Физико-химические механизмы разрушения ГС под воздействием питательных сред не ясны. Растворение изоморфов кремнезема обусловлено нуклеофильным воздействием диполей воды на связи ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) в сети (SiO₂)_n. Молекулы воды ориентируют свой электроотрицательный кислород к атому Si, перемещая электронную плотность на силоксановые связи, растягивая их вплоть до разрыва и высвобождая гидратированные атомы Si в составе кремниевой кислоты H₄SiO₄ (Dove et al., 1990). Переход от твердого вещества к растворенному в подобных материалах происходит через промежуточное состояние геля, изменение структуры каталитических центров, и неизбежно сопровождается выходом в раствор активных молекулярных групп и, прежде всего, силикатных полианионов (iSiO₄⁴⁻, где i – число атомов кремния), вытесняемых из ситаллов в ходе замены атомов кремния на атомы фосфора (Поляков и др. 2008; Douglass et al., 2018). В струк-

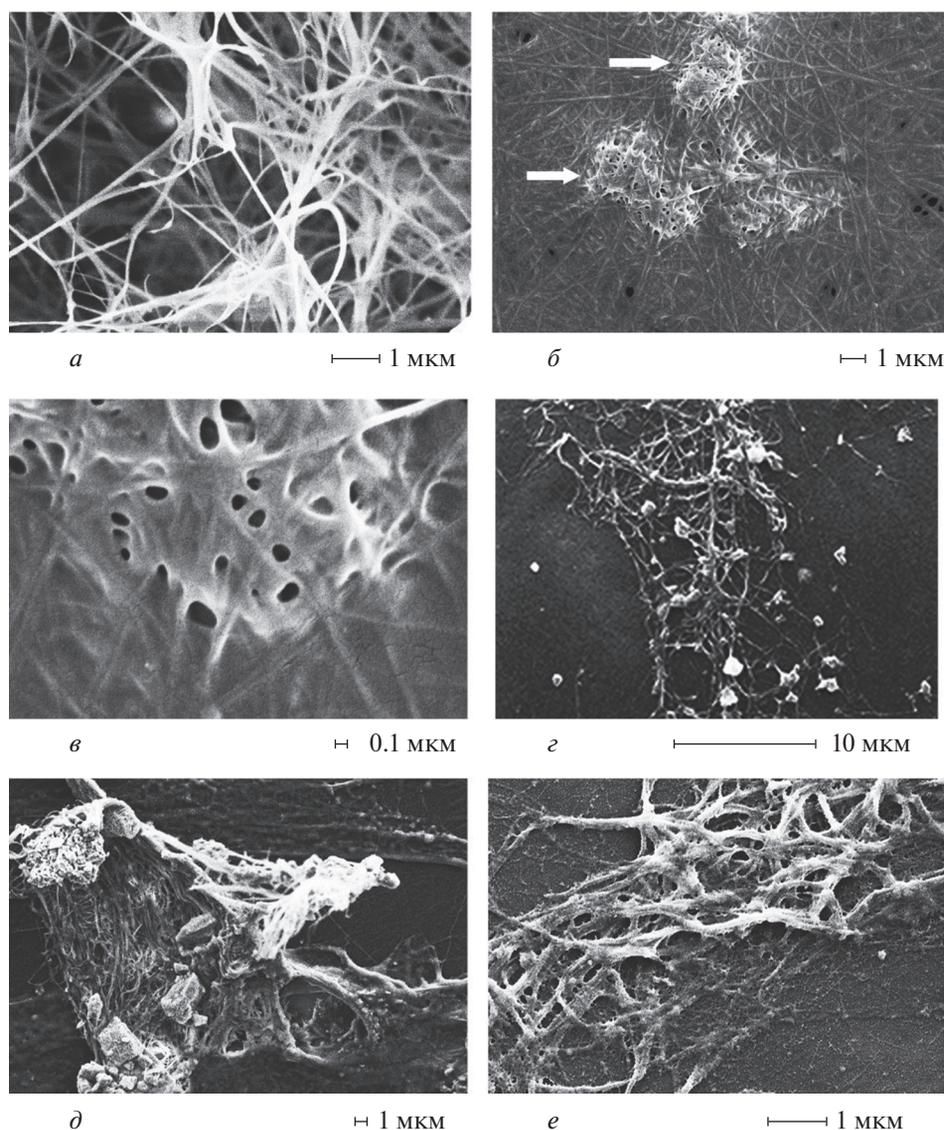


Рис. 1. Микрофотографии структурных трансформаций коллагеновой подложки в ходе культивирования МСК-КМ в дифференцировочной среде (сканирующая электронная микроскопия). *a* – Сетчатая структура подложки (3 сут); *б* – стромальные клетки, погруженные в коллагеновую подложку, 3 сут (стрелки); *в* – пористые структуры коллагенового покрытия стромальной клетки (3 сут); *г* – распад сетчатой структуры коллагеновой подложки (7 сут); *д* – разрыхление и отслоение пластинки компактизированных коллагеновых волокон (14 сут); *е* – утолщение и механические деформации коллагеновых волокон подложки (14 сут).

туре $iSiO_4^{4-}$ отсутствует дальний порядок, что снижает термодинамическую стабильность и ускоряет кинетику растворения (Alexandre et al., 1997). Вследствие этого повышаются связеобразующие свойства полианионов $iSiO_4^{4-}$, усиливающие сшивку органических макромолекул, в том числе и фибриллярного коллагена. Таким образом, в данной модели силикатные полианионы функционируют как гелеобразующие агенты.

Сшивающее действие является, по нашему мнению, наиболее вероятным механизмом компактизации коллагеновых волокон при участии ситаллов.

Все начинается с адгезии фибрилл, оплетающих минеральные частицы (рис. 3а), безусловно, приводящей к механической сшивке гранул. Силикаты вообще усиливают адгезионные взаимодействия между минеральной и органической фазами: ускоряется время схватывания пломбирочного (твердеющего или цементного) материала и увеличивается количество прилипших к нему клеток (Kang, 2020; Shie et al., 2012), склеиваются с костными трабекулами частицы гидроксиапатита (ГА) в кремнеземколлагеновом композите (Heinemann et al., 2013). Сшивающие свойства силикатов, конечно, синергичны имманентной способности к внеклеточной самосборке и

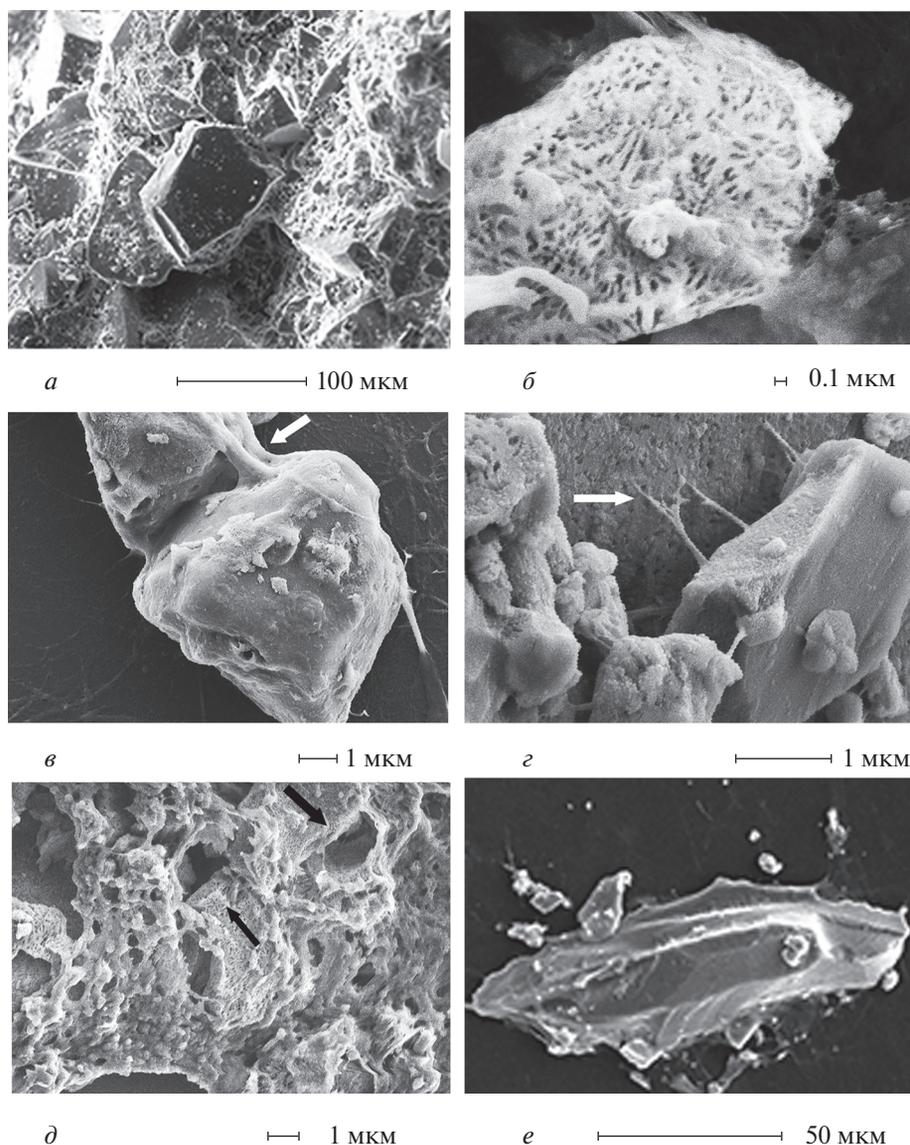


Рис. 2. Микрофотографии структурных преобразований гранул ситалла при инкубации в дифференцировочной среде (сканирующая электронная микроскопия). *a* – Структура исходного образца ситалла; *б* – пористая пленка на поверхности гранулы ситалла (3 сут); *в* – плотная пленка на поверхности, сшивающая гранулы ситалла, 3 сут (стрелка); *г* – волокнистые спайки, фиксирующие гранулы к подложке, 14 сут (стрелка); *д* – микроканалы в грануле ситалла, 14 сут (стрелки); *е* – линза на месте распавшейся гранулы ситалла (14 сут).

агрегации коллагеновых волокон с формированием протяженных пластинчатых структур.

Усиливается этот процесс стволовыми клетками, о чем свидетельствует массовое расселение клеточных клонов на обширных пленочных покрытиях ГС (рис. 3б). Покрытия перфорированы, что увеличивает площадь крепежной поверхности в узлах сплетения коллагеновых нитей (рис. 3в) и способствует равномерному распределению механических нагрузок. Пленки явно гибкие, так как интимно облегают шероховатую текстуру поверхности гранул (рис. 3г). В итоге гранулы пакетируются, связи упрочняются, лизис и распад сдерживаются. Механические моти-

вы, оптимизирующие прочностные свойства данной конструкции, по-видимому, являются целеполагающими индукторами не только хорошо организованного перфорирования, но и особого структурирования отверстий, придающих пластинкам сходство с гаверсифицированными костными ламеллами, появляющимися в очагах регенерации костной ткани и в эмбриональных закладках остеогенной направленности. Перфорирование, уплотнение и выстояние краев, многорядность и принятие отверстиями термодинамически выгодной округлой формы (рис. 3д) необратимый и в данных экспериментальных условиях довольно быстротечный процесс. Через 14 сут

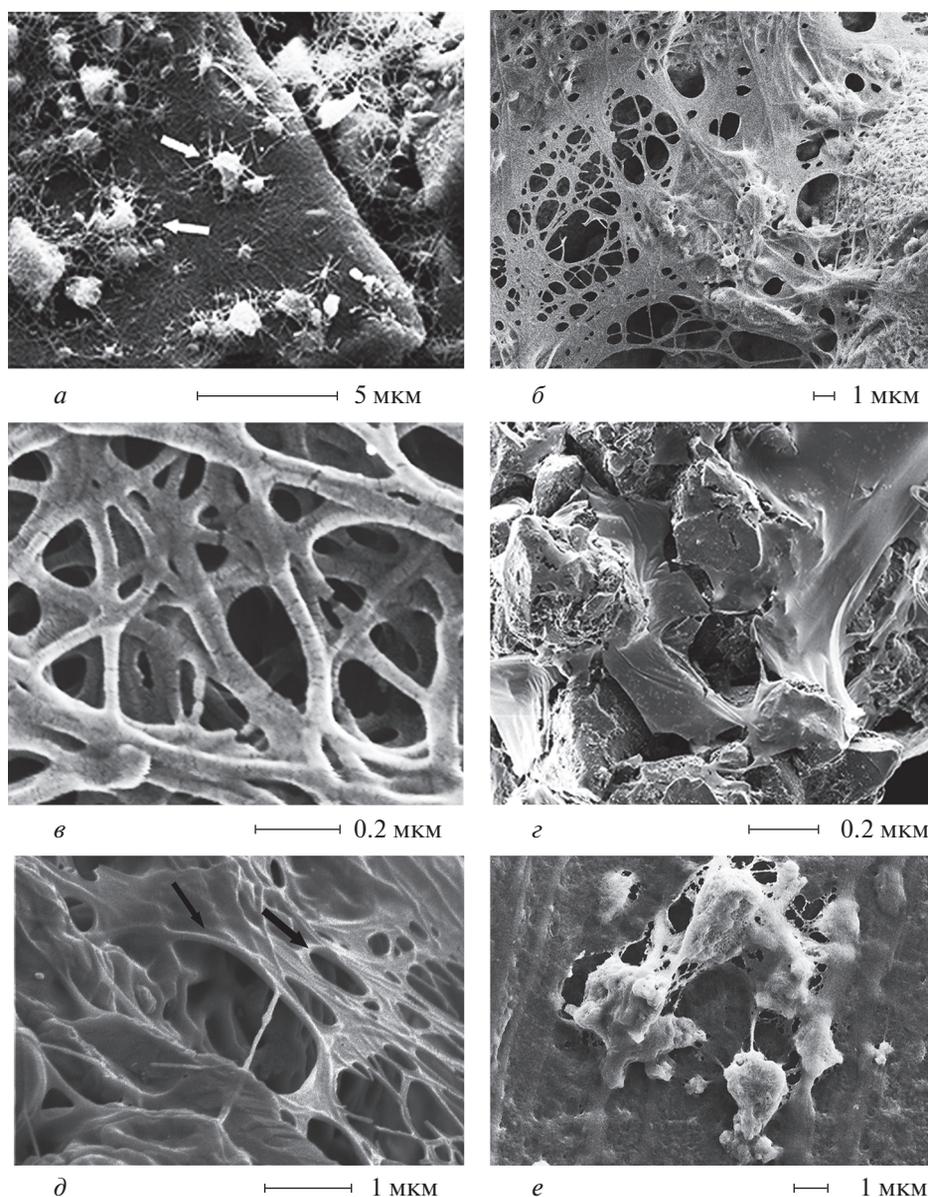


Рис. 3. Микрофотографии ранних стадий формирующихся остеοидных структур с участием гранул ситалла (сканирующая электронная микроскопия). *a* – Фиксация тонких нитей коллагеновых волокон к гранулам ситалла, 3 сут (*стрелки*); *б* – перфорированные пластинки и расположенные на их поверхности стромальные клетки (3 сут); *в* – межфибриллярные скрепления в тонкой пластинке (3 сут); *г* – эластичная пленка, огибающая текстуру поверхности гранулы (3 сут); *д* – перфорированный участок коллагеновой пластинки с уплотненными гаверсоподобными отверстиями (3 сут); *е* – дебрис с останками пластинчатых структур (14 сут).

культивирования большая часть ГС-ассоциированных ламелл разрушается, сохраняя в дебрисе обрывки с характерной структурой компактизированных коллагеновых волокон (рис. 3е).

Стволовые клетки чувствительны к действию остеοиндуктивных агентов, содержащихся в дифференцировочной среде. Наиболее ранним структурным откликом является гиперплазия везикул внутриклеточного матрикса. На коротких сроках культивирования МСК (до 7 сут) матриксные везикулы (МВ) имеют шаровидную форму и диаметр, варьи-

рующий от 30 до 500 нм (рис. 4а). При увеличении продолжительности культивирования МВ делятся почкованием (рис. 4б) и мигрируют во внеклеточное пространство, где увеличиваются в размерах путем слияния в крупные до 5–7 мкм формы (рис. 4в), адгезируя к наружной поверхности клеток (рис. 4г). Матриксные везикулы непосредственно взаимодействуют с ГС: оседают, прилипают, формируя полиморфные агрегаты (рис. 4д). Увеличение численности и размеров МВ с формированием мегаформ, безусловно, свидетельствует об активации процессов

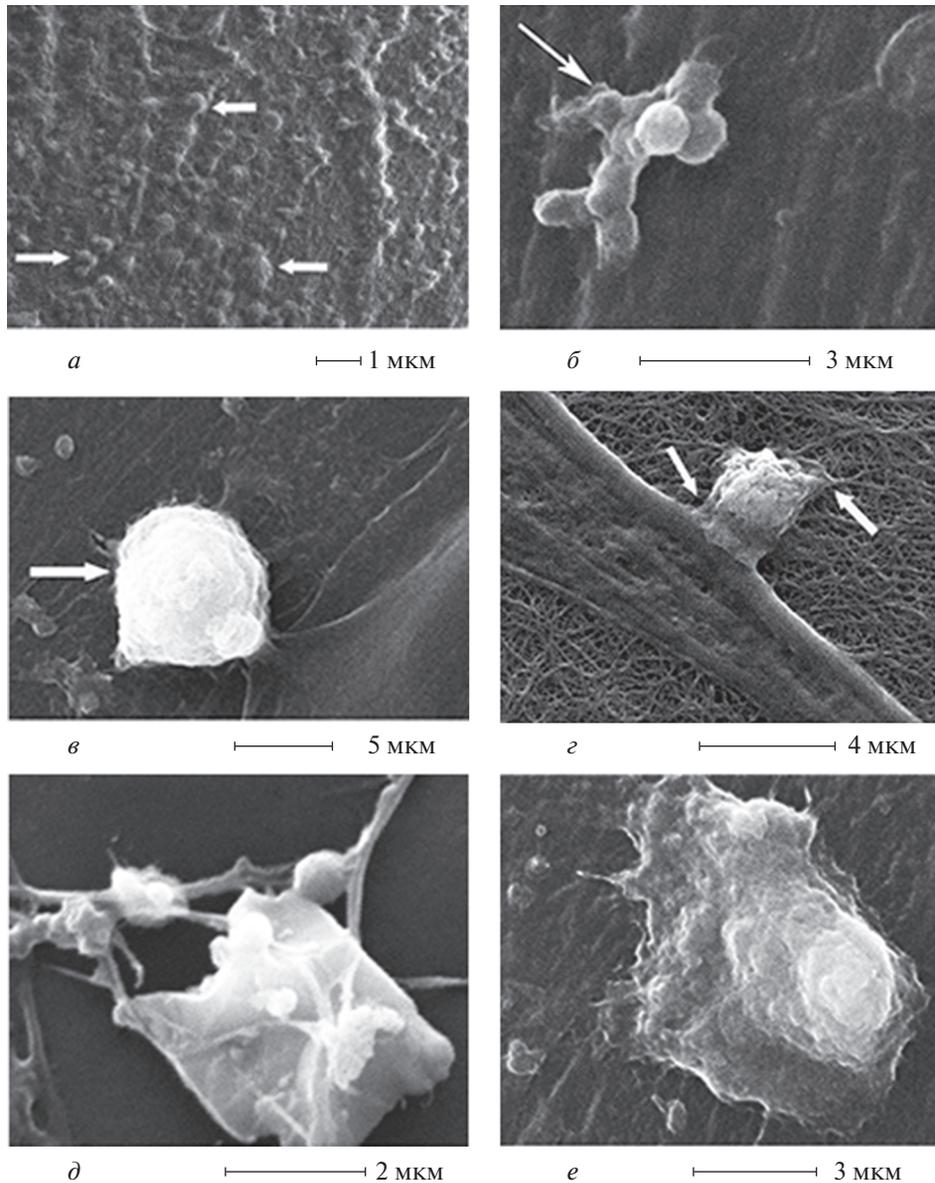


Рис. 4. Микрофотографии трансформаций матричных везикул при культивировании МСК-КМ в дифференцировочной среде (сканирующая электронная микроскопия). *а* – Гиперплазия матричных везикул в цитоплазме дифференцирующейся клетки, 3 сут (*стрелки*); *б* – деление матричных везикул путем почкования во внеклеточном матриксе, 7 сут (*стрелка*); *в* – гипертрофия и адгезия матричных везикул к поверхности клетки, 7 сут (*стрелка*); *г* – адгезия матричных везикул к волокнам внеклеточного матрикса, 7 сут (*стрелки*); *д* – адгезия матричных везикул и гранул ситалла к коллагеновым волокнам, 7 сут; *е* – адгезия слившихся матричных везикул к новообразованным коллагеновым волокнам, 7 сут.

гомогенной нуклеации. С учетом состава дифференцировочной среды можно с уверенностью заявить о стимулирующем действии остеогенных агентов, введенных в питательные среды.

МВ – основные структуры, обеспечивающие гомогенную нуклеацию кальцийфосфатов (КФ), и напрямую индуцируют первичную минерализацию в ходе остеогенеза. Везикулы содержат нуклеационные комплексы (НК), состоящие из АКФ, фосфатидилсерина и аннексина V. Основным механизмом формирования НК является накопление во внутри-

везикулярной жидкости кислотно-лабильной фазы, включающей ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} , в узком диапазоне значений pH между 7.4–7.8 (Valhmu et al., 1990). Интравезикулярные протеогликаны, обволакивая нуклеационные центры, создают диффузионный барьер, ограничивающий осаждение и распространение структурирующихся КФ (Howell et al., 1977). Везикулы имеют двуслойную цитолемму, по сравнению с плазматической мембраной более обогащенную сфингомиелином и фосфатидилсерином (Wuthier, 1975), связывающими и блокирующими проникно-

вание в МВ ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} , ингибируя тем самым минералогенез (Wu et al., 2002). Фосфолипазы деградируют липиды и, обеспечивая доступ Ca^{2+} и PO_4^{3-} к термодинамически устоявшимся центрам нуклеации (Blandford et al., 2003), стимулируют таким образом структурирование КФ.

Процессы гомогенной нуклеации поддерживаются нарастающим накоплением в нуклеационных ядрах Ca^{2+} и PO_4^{3-} в нерастворимых формах, проникающих в МВ из материнской фазы (культуральной жидкости), перенасыщенной КФ. Возможно, именно поэтому процессы гомогенной нуклеации активируются в непосредственной близости от микрозерен — источников ионных пар Ca^{2+} и PO_4^{3-} , направленно мигрирующих по механизму электрохимического градиента к МВ внеклеточного матрикса. Приближение микрозерен к зонам избыточной концентрации химических прекурсоров приводит к увеличению степени локального пересыщения и повышает вероятность возникновения зародышей АКФ. Кластеры АКФ образуются через формирование отдельных структурных субъединиц $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ диаметром ~1.0 нм, объединяющихся в группы Поснера $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3$ — энергетически наиболее устойчивые конфигурации прото-ядер, агрегирующиеся в частицы диаметром ~110 нм, не содержащие кристаллиты минерала и потому рентгеноаморфные (Wu et al., 1997). В местах минерализации за счет увеличения локальной концентрации фосфата и гидролиза неорганических пирофосфатов $\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$ (одних из самых мощных ингибиторов апатитогенеза) концентрация ионов кальция и фосфатов превышает точку их растворимости и накапливаются средние и основные КФ (Wuthier et al., 1972). По достижению критической концентрации структурированных КФ скачкообразно запускается кристаллизация ядер октакальцийфосфатов (ОКФ): зародыши структурирующихся КФ через трехсуточную лаг-стадию массово оседают на поверхностях ГС к 14 сут культивирования.

Везикулы внеклеточного матрикса в пространстве клеточной культуры распределены неравномерно. Вблизи коллагеновых субфибрилл, образованных *de novo*, ориентируются в основном крупные почкующиеся везикулы правильной округлой формы с четкими линиями мембран (рис. 4е). Многие МВ избирательно адгезированы к узким участкам волокон, возможно, стремясь к установлению связей аннексинов с С-телопептидами. Формирование такого рода интерфейса с одной стороны свидетельствует о структурной зрелости новообразованных фибрилл, а с другой, способствует локальному накоплению ионов Ca^{2+} (Kirsch et al., 1994). Матриксные везикулы, дислоцированные в очагах отслоения коллагеновой подложки, менее крупные, контуры мембраны размыты, в популяции доминируют дефектные формы МВ. Таким образом, матриксные

везикулы дифференцированно вовлекаются в ассоциирование с коллагеновыми волокнами в зависимости от степени структурно-метаболической конгруэнтности обоих партнеров.

В условиях культивирования гомогенная нуклеация осуществляется не изолированно, а в общем остеогенетическом тренде, направленном на образование костных пластинок. Вышеописанное структурирование плотных пластинок на ГС останавливается на 3–7 сут культивирования в дифференцировочной среде вследствие распада ГС в связи со структурно-механической несостоятельностью перфорированных пластин. Через 10–14 сут культивирования процессы компактизации коллагеновых волокон и структурирования КФ перемещаются в стволовые клетки, дифференцирующиеся в остеогенном направлении. Клетки активно, начиная с 3 сут культивирования в дифференцировочной среде, синтезируют пре-коллагены, вступающие во взаимодействие с МВ в ходе внутриклеточной самосборки (рис. 5а). Это может быть прямым следствием вторжения носителей силоксановых связей внутрь клеток, что вообще свойственно кремнийсодержащим соединениям, например, метасиликату натрия, который действует внутриклеточно, способствует образованию минерализованных конкреций и активирует синтез фибриллярного коллагена I типа в остеобластах (Kim et al., 2013).

Фибриллы проявляют морфологические признаки структурной зрелости в виде упорядоченного чередования (с периодом в пределах 70–80 нм) тонких и толстых участков доменов первичных полипептидных цепей фибриллярного коллагена I типа. Одновременно с этим значительная часть нитей тропоколлагенов секретруется в ближайшее внеклеточное пространство (рис. 5б) и далее компактизируется в полупрозрачные пластинки (рис. 5в). Кроме внеклеточной, активно функционирует и внутриклеточная компактизация коллагеновых фибрилл, заканчивающаяся формированием толстых шнуров или же пластин, выталкиваемых из клеток (рис. 5г). Очевидно, что стволовые клетки дифференцировались в коллагенпродуцирующие остеобласты, которые способны генерировать энергетичные тяговые силы, позволяющие перемещать довольно массивные пакеты фибриллярного материала. Цитоплазма дифференцирующихся клеток уплотняется, МВ мигрируют в вытянутые перфорированные отростки, превращающиеся в отростчатые пластинчатые структуры (рис. 5д).

Минерализация костных пластинок осуществляется по механизмам гомо- и гетерогенной нуклеации. О гомогенной нуклеации свидетельствует локальное накопление МВ, а о гетерогенной — формирование депозитов на поверхностях кальцифицированных структур — остатков петрифицированных клеток и вытянутых отростчатых пластинок. Локальное накопление МВ происходит внеклеточно, в местах выхода

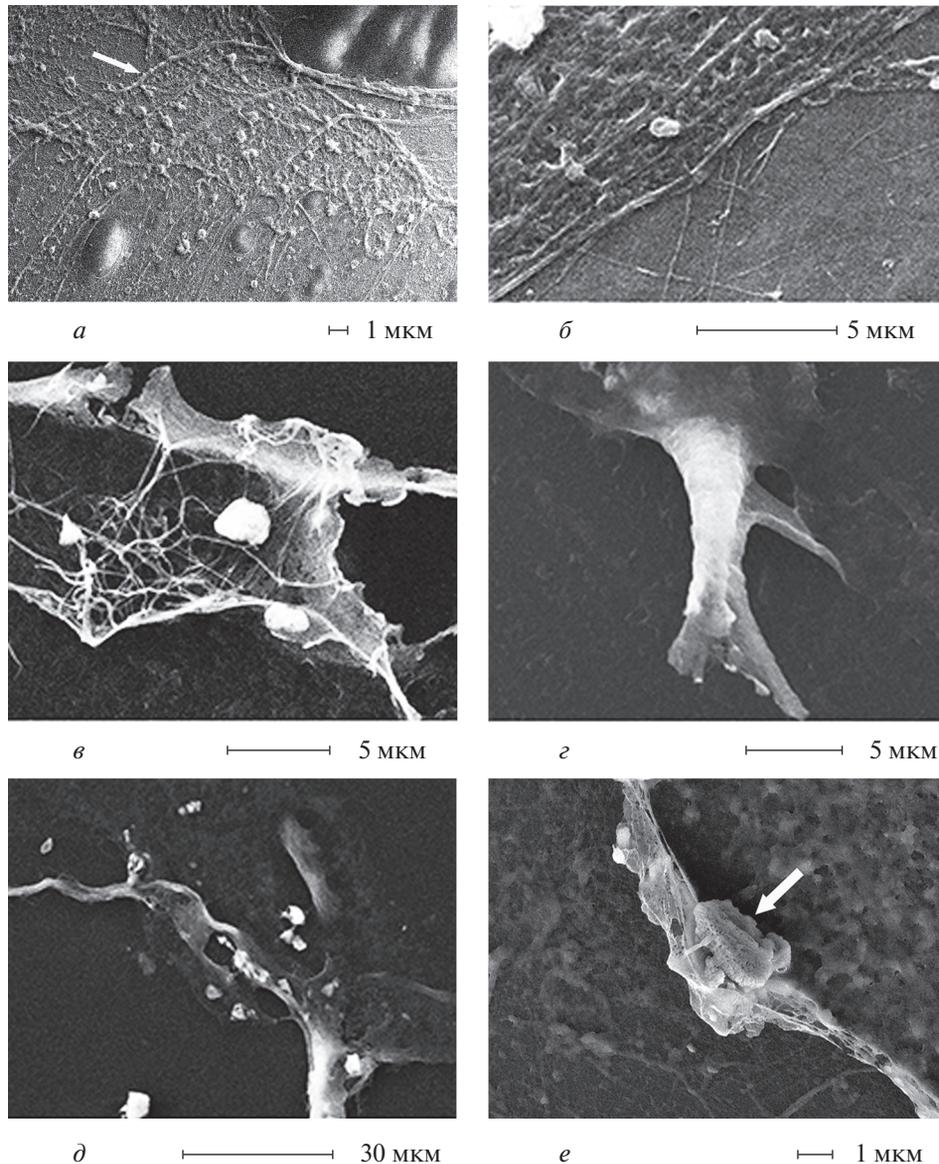


Рис. 5. Микрофотографии предшественников костных пластинок при культивировании МСК-КМ в дифференцировочной среде (сканирующая электронная микроскопия). *a* – Гиперплазия матричных везикул в месте внутриклеточной компактизации протоколлагена, 14 сут (*стрелка*); *b* – секретированные во внеклеточное пространство коллагеновые фибриллы, 14 сут; *c* – полупрозрачная сформировавшаяся пластинка с адгезированными гранулами ситалла, 14 сут; *d* – отростчатая пластинка с адгезированными матричными везикулами и микрогранулами ситалла, 14 сут; *e* – депозит на поверхности минерализованных коллагеновых волокон, 14 сут (*стрелка*).

компактизирующихся нитей тропоколлагена. В результате в поверхностных слоях цитоплазмы формируются минерализованные полосы.

Минерализация коллагеновых волокон, контактирующих с ГС, имеет свои особенности. Здесь явно интенсифицируются процессы компактизации коллагеновых волокон, инфильтрирующих расширенные поры гранул с формированием структурных прекурсоров костных пластинок, нередко обрастающих крупные гранулы, склонных к разрушению. По данным локального элементного микроанализа (ЭДС) микрогранулы пересыщены кальцием, десорбирую-

щимся в ходе деструкции из ГС. Кроме того, источником кальция являются также и питательные среды, где он изначально присутствует в составе солей. Заметим, что включение различных фаз КФ повышает активность кремнезем/коллагеновых комплексов (Heinemann et al., 2009). Как бы ни было, но в окружении микрогранул создается концентрационный градиент по КФ, инициирующий минерализацию коллагеновых фибрилл по механизму гетерогенной нуклеации. Морфологически эти процессы визуализируются в виде отложения минерально-органических депозитов на коллагеновых субфибриллах

с размерами, варьирующими от 100 нм до 3–5 мкм в зависимости от продолжительности культивирования. В состав депозитов входят пористые ГС, МВ диаметром до 1 мкм, фрагменты коллагеновых фибрилл. Некоторые депозиты имеют полигональную форму (рис. 5e).

Процессы гетерогенной нуклеации стартуют с осаждения сферических наночастиц АКФ в просветах интердигитирующих каналов — щелевидных пространств (зазоров) между сдвинутыми на четверть длины нитями тропоколлагенов. Численная плотность нитей тропоколлагенов и, соответственно, ширина зазоров в разных участках доменов отличается: в плотных (длиной до 35 нм) диаметр щелей не выше 1 нм. В рыхлых зонах интердигитирующие каналы представляют собой цилиндрические поры диаметром в пределах 2 нм (Xu et al., 2020). Преципитацию АКФ ускоряют положительный суммарный заряд С-концевых отделов коллагеновых волокон, увеличение рН в водных доменах и уплотнение наружной жидкой фазы гидратированных ионов КФ (чему способствует агрегация частиц АКФ с аспартамом), шероховатая текстура чередующихся выступов (впадин) коллагеновых фибрилл (Nudelman et al., 2010; Veis et al., 2012). Внутрифибрилярное структурирование АКФ происходит в ограниченном пространстве интердигитирующих каналов, где размер пор явно критичен по отношению к размерам субъединиц АКФ (~1 нм), имеющих, кроме того, не менее критично высокую (относительно объема) площадь поверхности. Без минимизации экстремальных уровней реактивной площади поверхности и, соответственно, избыточной свободной энергии структурирование ядер АКФ станет термодинамически запрещенным.

Структурно-геометрические особенности интердигитирующих каналов, по сути являющихся природной разновидностью мягких гибких нанотрубок, создают предпосылки для срабатывания эффекта наноразмерного удержания (конфайнмент), направленного на снижение уровней энергетических барьеров (Cantaert et al., 2013; Cantaert et al., 2013; Kim et al., 2018). Особое значение это имеет для нивелирования последствий структурного несоответствия при эпитаксиальном взаимодействии коллагеновых матриц и структурирующихся ядер АКФ. Это та ситуация, при которой именно внутрифибрилярный конфайнмент реализует термодинамически разрешенный тренд преобразования полиморфных сферических кластеров АКФ в монокристаллические наностержни ОКФ, которые трансформируются в стабильные двумерные поликристаллиты ГА, ориентированные по быстрорастущим осям. При этом росту кристаллитов не препятствуют стенки интердигитирующих каналов. Окончательные точки анизотропного роста структурирующихся КФ в нанокристаллиты ГА — это концевые отделы доменов нитей протоколлагенов.

Вышеприведенные морфологические и топологические особенности минерализации коллагеновых волокон свидетельствуют о наличии двух центров, где активно осуществляются эти процессы. Первый центр — околочелочное пространство, место выхода пре-коллагенов и формирования тропоколлагена. Второй — ГС, места наибольшей концентрации КФ. Вне этих центров процессы минерализации коллагеновых волокон практически не происходят. Напомним, что источником используемого в данном исследовании экзоколлагена являются сухожилия, обработанные уксусной кислотой. Возможно, в ходе кислотной экстракции утрачиваются структурно-молекулярные атрибуты, необходимые для минерализации. Одним из таковых может быть дезорганизованная доменная структура, обусловленная либо кислотной экстракцией фибриллярного коллагена, либо его скоротечным старением в процессе культивирования. В волокнах подложки, исходящих из экзогенного коллагена и лежащих вдали от клеток и за пределами ГС, признаки доменной организации слабо выражены.

Финальной стадией остеогенеза в условиях *in vitro* является образование костных пластинок, с характерной структурой, оформляющейся в период между 7 и 14 сут при культивировании в дифференцировочной среде. Все начинается, по-видимому, с уплотнения краевых отделов клетки (рис. 6a), кальцифицирующихся в точках контакта при взаимодействии с ГС (рис. 6б). Толстые стержни компактизированных коллагеновых волокон прорастают клеточную мембрану (рис. 6в), а на поверхности клеток появляются пластинчатые выросты агрегированных коллагеновых волокон с характерными гаверсоподобными отверстиями. Форма и размеры пластинок варьируют, но в основном представлены отростчатые, подковообразные экземпляры (рис. 6г, д) размерами от 13 мкм до 50 мкм. Окончательным этапом является отрыв костных пластинок от клеток и их свободное перемещение в инкубационной жидкости. Флотирующие пластинки имеют характерный вид: приподнятые отростки, широкие гаверсоподобные отверстия, плотное кальцифицированное тело (рис. 6е). Принципиально важным этапом морфогенеза остеонидных структур является стремление освободившихся костных пластинок к слиянию с формированием относительно толстых, разветвляющихся трабекулоподобных структур. На этом этапе остеогенетический потенциал клеточных культур в примененном формате исчерпывается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование остеонидных структур в условиях *in vitro* складывается из остеогенетических событий, происходящих внутри дифференцирующихся клеток, в интрафибрилярном и экстрафибрилярном пространствах. Остеогенез стартует с усиления синтеза фибриллярного коллагена и везикул внутрикле-

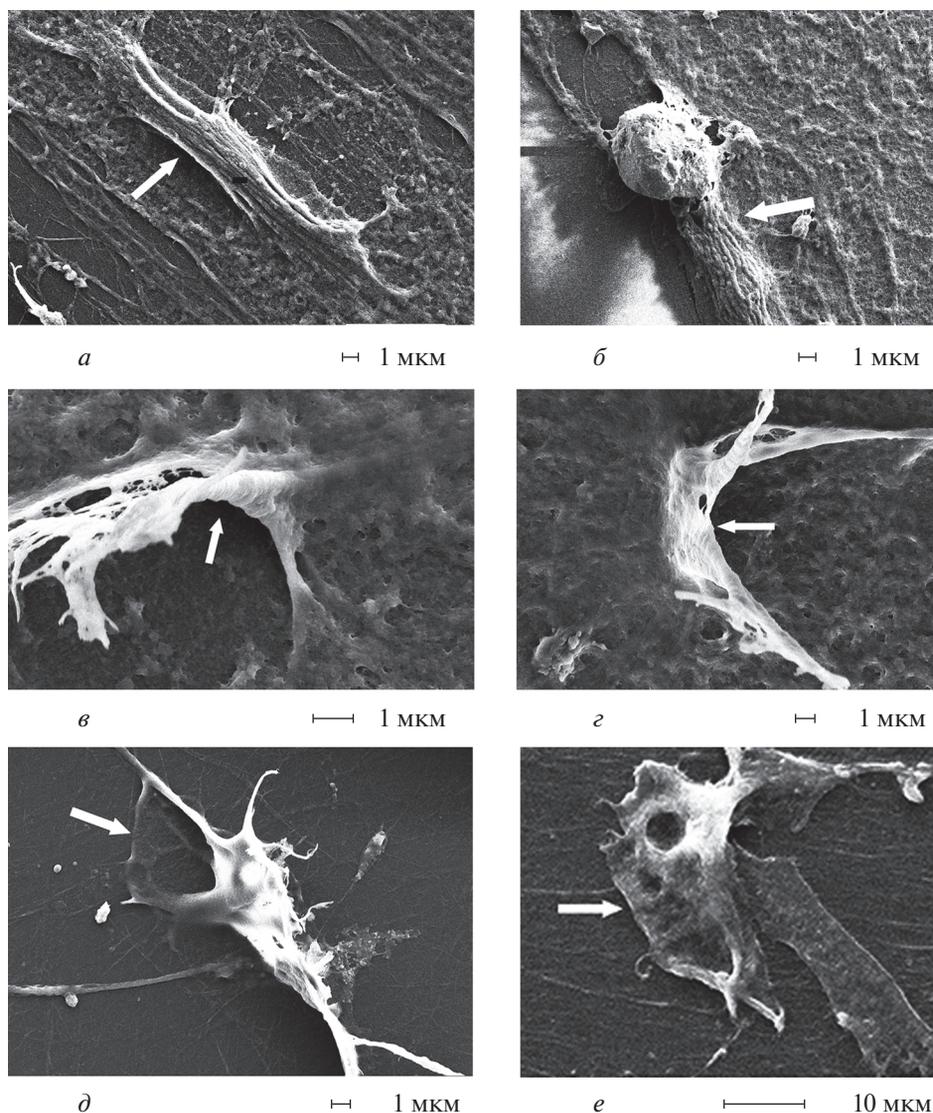


Рис. 6. Микрофотографии ранних стадий остеогенеза при культивировании МСК-КМ в дифференцировочной среде (сканирующая электронная микроскопия). *а* – Уплотнение внутриклеточного матрикса, 14 сут (*стрелка*); *б* – очаг минерализации внутриклеточного матрикса в области контакта с гранулой ситалла, 14 сут (*стрелка*); *в* – экструзия компактизированной пластинки с гаверсоподобными отверстиями из клетки, 14 сут (*стрелка*); *г* – подковообразная зрелая костная пластинка на поверхности клетки, 14 сут (*стрелка*); *д* – отросчатая костная пластинка на поверхности разрушенной клетки, 14 сут; *е* – оторвавшаяся свободно флотирующая костная пластинка, 14 сут (*стрелка*).

точного матрикса, их сопряженная гиперплазия и гипертрофия, секреция, внеклеточная самосборка фибрилл, направленная миграция везикул и избирательное вовлечение обоих партнеров в адгезионные и метаболические взаимоотношения. События, возникая вначале стохастически в виде разрозненных очагов остеогенетической активности, по мере увеличения продолжительности культивирования синхронизируются. В целом, ранние стадии морфогенеза остеодных структур в условиях *in vitro* складываются из следующих этапов:

1) Усиление активности МВ, сопровождающееся гиперплазией, гипертрофией и направленной миграцией в зоны минерализации.

2) Компактизация коллагеновых волокон и паке-тирование их в пластинчатые структуры.

3) Упорядоченное перфорирование и формирование гаверсифицированных прекурсоров костных ламелл.

4) Рост компактизированных коллагеновых волокон и экструзия их из клеток.

5) Созревание костных ламелл на поверхности клеток.

6) Отрыв от клеток и свободное флотирование созревших костных ламелл.

7) Агрегирование ламелл во внеклеточном пространстве и формирование трабекул, как окончательная стадия остеогенеза в условиях *in vitro*.

В механизмах минерализации остеоидных структур непосредственное участие принимают процессы гомо- и гетерогенной нуклеации КФ, а также кон-файнмент, катализирующий кристаллогенез в ультратонких каналах коллагеновых фибрилл. Электронно-микроскопически усиление гомогенной нуклеации верифицируется везикуляцией и ассоцированием МВ с коллагеновыми волокнами. Гетерогенная нуклеация осуществляется интрафибрилярно – в виде увеличения количества, уплотнения и осаждения наноразмерных преципитатов КФ в интердигитирующих каналах, а также экстрафибрилярно – в виде отложения депозитов на поверхностях коллагеновых волокон.

Стеклокристаллический материал “Биосит-Ср Элкор” в ходе культивирования частично растворяется и подвергается распаду. При растворении в межклеточный матрикс выделяются сшивающие, поверхностно-активные химические агенты, а также КФ. В результате синергичного действия усиливается компактизация коллагеновых волокон, расправляются и перфорируются пластинчатые структуры, провоцируется коагуляция органической фазы и минерализация клеток и коллагеновой подложки. Таким образом, стеклокристаллический материал “Биосит-Ср Элкор” оказывает стимулирующее действие на остеогенез в условиях *in vitro*, но ускоряет инволютивные изменения в дифференцирующихся клетках. Неоднозначность влияния силиколюмофосфатов на морфогенез остеоидных структур делает необходимым проведение дальнейших исследований, уточняющих биотехнологические перспективы этого материала, биологическая активность которого еще во многом не изучена.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена частично в рамках Государственной программы научных исследований Института общей и неорганической химии НАН Белоруссии “Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганическая химия” по заданию 2.1.04 НИР 7 на 2021–2025 гг. (аналитические и электронно-микроскопические исследования) и частично – на базе Центра клеточных технологий Института цитологии РАН при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20120; работы по выделению коллагена и эксперименты *in vitro* с мезенхимными стромальными клетками).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интереса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Елагина И.А., Лысенко Л.Н., Фоломеева Г.П.* 1999. Остеопластический стеклокристаллический композиционный материал для изготовления пористых имплантатов в виде гранул и способ их получения. Патент RU 2132702 С1. Номер заяв. 97121824/14. Дата регистрации: 26.12.1997. Дата публикации: 10.07.1999. (*Elagina I.A., Lysenok L.N., Folomeeva G.P.* 1999. Osteoplasticheskiy steklokrisatlicheskiy kompozicionnyy material dlya izgotovleniya poristyh implantatov v vide granul i sposob ih polucheniya. Patent RU 2132702 С1. Nomer zayav. 97121824/14. Data registracii: 26.12.1997. Data publikacii: 10.07.1999.)
- Кухарева Л.В., Парамонов Б.А., Шамолина И.И., Семенова Е.Г.* 2003. Способ получения коллагена для лечения патологий тканей организма. Патент. RU 2214827. (*Kuhareva L.V., Paramonov B.A., SHamolina I.I., Semenova E.G.* 2003. Sposob polucheniya kollagena dlya lecheniya patologij tkanej organizma. Patent. RU 2214827.)
- Николаенко Н.С.* 2008. Стволовые клетки взрослого организма в культуре. 2008. В кн.: Методы культивирования клеток. СПб.: Изд-во Политехн. Ун-та. С. 188. (*Nikolaenko N.S.* 2008. Stvolovye kletki vzroslogo organizma v kul'ture. 2008. V kn.: Metody kul'tivirovaniya kletok. SPb.: Izd-vo Politekhn. Un-ta. S. 188.)
- Поляков В.Б., Арискин А.А.* 2008. Моделирование состава и пропорций анионов в полимеризованных силикатных расплавах. Физика и химия стекла. Т. 35. № 1. С. 66. (*Polyakov V.B., Ariskin A.A.* 2008. Modeling the composition and proportion of anions in polymerized silicate melts. Phys. Chem. Glass. V. 35. № 1. P. 66.)
- Швед Ю.А., Кухарева Л.В., Зорин И.М., Блинова М.И., Билибин А.Ю., Пинаев Г.П.* 2007. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полилактидную матрицу. Цитология. Т. 49. № 1. С. 32. (*Shved Yu.A., Kухareva L.V., Zorin I.M., Blinova M.I., Bilibin A.YU., Pinayev G.P.* 2007. Vzaimodeystviye kul'tiviruyemykh kletok kozhi s raznymi strukturnymi formami kollagena, nanesenного na polilaktidnyuyu matritsu. Tsitologiya. V.49. №1. P. 32.)
- Akhtar F., Andersson L., Ogunwum, S., Hedin N., Bergström L.* 2014. Structuring adsorbents and catalysts by processing of porous powders. J. Europ. Ceram. Soc. V. 34. P. 1643. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2014.01.008>
- Alexandre A., Meunier J.D., Colin F., Koud J.M.* 1997. Plant impact on the biogeochemical cycle of silicon and related weathering processes. Geochim. Cosmochim. Acta. V. 61. P. 677.
- Aripova M., Mkrтчan R.* 2020. In vitro study of biodegradation of glass and glass crystals of the R₂O–RO–CaF₂–P₂O₅–Al₂O₃–SiO₂ system. Chem. Chem. Eng. V. 3. P. 3. <https://doi.org/10.51348/VLHK9013>
- Bae Y.-J., Kim J.-Y., Choi M.-K., Chung Y.-S., Kim M.-H.* 2008. Short-term administration of water-soluble silicon improves mineral density of the femur and tibia in ovariectomized rats. Biol. Trace Elem. Res. V. 124. P. 157. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8138-3>

- Blandford N.R., Sauer G.R., Genge B.R., Wu L.N.Y., Wuthier R.E. 2003. Modeling of matrix vesicle biomineralization using large unilamellar vesicles. *J. Inorg. Biochem.* V. 94. P. 14. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00629-3](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00629-3)
- Bu S.Y., Kim M.-H., Choi M.-K. 2015. Effect of silicon supplementation on bone status in ovariectomized rats under calcium-replete condition. *Biol. Trace Elem. Res.* V. 171. P. 138. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0506-1>
- Cantaert B., Beniash E., Meldrum F.C. 2013a. Nanoscale confinement controls the crystallization of calcium phosphate: Relevance to bone formation. *Chemistry – A Eur. J.* V. 19. P. 14918. <https://doi.org/10.1002/chem.201302835>
- Cantaert B., Beniash E., Meldrum F.C. 2013b. The role of poly(aspartic acid) in the precipitation of calcium phosphate in confinement. *J. Mater. Chem. B.* V. 1. P. 6586. <https://doi.org/10.1039/c3tb21296c>
- Douglass I., Harrowell P. 2018. Kinetics of dissolution of an amorphous solid. *J. Phys. Chem. B.* V. 122. P. 2425. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12243>
- Dove P.M., Crerar D.A. 1990. Kinetics of quartz dissolution in electrolyte solutions using a hydrothermal mixed flow reactor. *Geochim. Cosmochim. Acta.* V. 54. P. 955. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(90\)90431-J](https://doi.org/10.1016/0016-7037(90)90431-J)
- Fujdala K.L., Tilley T.D. 2001. An efficient, single-source molecular precursor to silicoaluminophosphates. *J. Am. Chem. Soc.* V. 123. P. 10133. <https://doi.org/10.1021/ja0167295>
- Heinemann S., Heinemann C., Bernhardt R., Reinstorf A., Nies B., Meyer M., ... Hanke T. 2009. Bioactive silica–collagen composite xerogels modified by calcium phosphate phases with adjustable mechanical properties for bone replacement. *Acta Biomater.* V. 5. P. 1979. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.02.029>
- Heinemann S., Heinemann C., Wenisch S., Alt V., Worch H., Hanke T. 2013. Calcium phosphate phases integrated in silica/collagen nanocomposite xerogels enhance the bioactivity and ultimately manipulate the osteoblast/osteoclast ratio in a human co-culture model. *Acta Biomater.* V. 9. P. 4878. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.010>
- Howell D.S., Pita J.C. 1977. Role of proteoglycans in calcification of cartilage. *Upsala J. Med. Sci.* V. 82. P. 97. <https://doi.org/10.3109/03009737709179080>
- Kang S. 2020. Mineralization-inducing potentials of calcium silicate-based pulp capping materials in human dental pulp cells. *Yeungnam Univ. J. Med.* V. 37. P. 217. <https://doi.org/10.12701/yujm.2020.00248>
- Kim D., Lee B., Thomopoulos S., Jun Y.-S. 2018. The role of confined collagen geometry in decreasing nucleation energy barriers to intrafibrillar mineralization. *Nature Commun.* V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03041-1>
- Kim E.-J., Bu S.-Y., Sung M.-K., Choi M.-K. 2013. Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* V. 152. P. 105. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9593-4>
- Kim M.-H., Bae Y.-J., Choi M.-K., Chung Y.-S. 2009. Silicon supplementation improves the bone mineral density of calcium-deficient ovariectomized rats by reducing bone re-sorption. *Biol. Trace Elem. Res.* V. 128. P. 239. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8273-x>
- Kirsch T., Wuthier R.E. 1994. Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *J. Biol. Chem.* V. 269. P. 11462.
- Knyazeva E.E., Bok T.O., Kolozhvari B.A., Dobryakova I.V., Ivanova I.I. 2019. Preparation of binderless silicoaluminophosphates by vapor-phase crystallization of kaolin–phosphoric acid grains. *Petroleum Chem.* V. 59. P. 845. <https://doi.org/10.1134/S0965544119080073>
- Laruelle G.G., Roubeix V., Sferratore A., Brodherr B., Ciuffa D., Conley D.J., Durr H.H., Garnier J., Lancelot C., Le Thi Phuong Q., Meunier J.-D., Meybeck M., Michalopoulos P., Moriceau B., Ni' Longphuir S. et al. 2009. Anthropogenic perturbations of the silicon cycle at the global scale: Key role of the land–ocean transition. *Global Biogeochem. Cycles.* V. 23. P. GB4031. <https://doi.org/10.1029/2008gb003267>
- Li Y., Wang X., Thersleff T., Svensson G., Hedin N. 2019. Silicoaluminophosphate (SAPO)-templated activated carbons. *ACS Omega.* V. 4. P. 9889. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00135>
- Lok B.M., Messina C.A., Lyle Patton R., Gajek R.T., Cannan T.R., Flanigen E.M. 1984. Silicoaluminophosphate molecular sieves: Another new class of microporous crystalline inorganic solids. *J. Am. Chem. Soc.* V. 106. P. 6092.
- Luo X., Yang H., Niu L., Mao J., Huang C., Pashley D.H., Tay F.R. 2016. Translation of a solution-based biomineralization concept into a carrier-based delivery system via the use of expanded-pore mesoporous silica. *Acta Biomater.* V. 31. P. 378. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.062>
- Nelson C.M., Bissell M.J. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: Tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* V. 22. P. 287.
- Nikolić J.D., Tošić M.B., Grujić S.R., Živanović V.D., Došić M.S., Matijašević S.D., Smiljanić S.V. 2017. Dissolution behavior of a polyphosphate glass in simulated body fluid. *J. Serb. Chem. Soc.* V. 82. P. 329. <https://doi.org/10.2298/JSC161031009N>
- Nudelman F., Pieterse K., George A., Bomans P.H.H., Friedrich H., Brylka L.J., Hilbers P.A. J., Gijbertus de With, Sommerdijk N.A.J.M. 2010. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Mater.* V. 9. P. 1004. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>
- Peng Q., Wang G., Wang Z., Jiang R., Wang D., Chen J., Huang J. 2018. Tuning hydrocarbon Pool Intermediates by the Acidity of SAPO-34 Catalysts for improving methanol-to-olefins reaction. *ACS Sustainable Chem. Eng.* V. 6. P. 16867. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04210>
- Rodella L.F., Bonazza V., Labanca M., Lonati C., Rezzani R. 2014. A review of the effects of dietary silicon intake on bone homeostasis and regeneration. *J. Nutrition Health Aging.* V. 18. P. 820. <https://doi.org/10.1007/s12603-014-0555-8>
- Shie M.Y., Chang H.C., Ding S.J. 2012. Effects of altering the Si/Ca molar ratio of a calcium silicate cement on in vitro cell attachment. *Int. Endodontic J.* V. 45. P. 337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01981.x>
- Sinha A.K., Hegde S.G., Jacob N.E., Sivasanker S. 1997. Preparation and characterization of the silicoaluminophosphate

- SAPO-39. Zeolites. V. 18. P. 350.
[https://doi.org/10.1016/s0144-2449\(97\)00026-2](https://doi.org/10.1016/s0144-2449(97)00026-2)
- Valmu W.B., Wu L.N.Y., Wuthier R.E. 1990. Effects of ratio, $\text{Ca}^{2+} \times \text{Pi}$ ion product, and pH of incubation fluid on accumulation of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by matrix vesicles in vitro. Bone Mineral. V. 8. P. 195.
[https://doi.org/10.1016/0169-6009\(90\)90105-o](https://doi.org/10.1016/0169-6009(90)90105-o)
- Veis A., Dorvee J.R. 2012. Biomineralization mechanisms: A new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. Calcified Tissue Internat. V. 93. P. 307.
<https://doi.org/10.1007/s00223-012-9678-2>
- Wang Y.-S., Alrefaei Y., Dai J.-G. 2019. Silico-aluminophosphate and alkali-aluminosilicate geopolymers: A comparative review. Frontiers Materials. V. 6. P. 106.
<https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00106>
- Wei S., Wu H., Luo X. 2020. Biomineralization precursor carrier system based on carboxyl-functionalized large pore mesoporous silica nanoparticles. Current Med. Sci. V. 40. P. 155.
<https://doi.org/10.1007/s11596-020-2159-3>
- Wu L.N.Y., Genge B.R., Dunkelberger D.G., LeGeros R.Z., Concanon B., Wuthier R.E. 1997. Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles. J. Biolog. Chem. V. 272. P. 4404.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4404>
- Wu L.N.Y., Genge B.R., Kang M.W., Arsenault A.L., Wuthier R.E. 2002. Changes in phospholipid extractability and composition accompany mineralization of chicken growth plate cartilage matrix vesicles. J. Biol. Chem. V. 277. P. 5126.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m107899200>
- Wuthier R.E. 1975. Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. Biochim. Biophys. Acta. — Lipids Lipid Metab. V. 409. P. 128.
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(75\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(75)90087-9)
- Wuthier R.E., Bisaz S., Russell R.G.G., Fleisch H. 1972. Relationship between pyrophosphate, amorphous calcium phosphate and other factors in the sequence of calcification in vivo. Calcified Tissue Res. V. 10. P. 198.
<https://doi.org/10.1007/bf02012549>
- Xu Y., Nudelman F., Eren E.D., Wirix M.J.M., Cantaert B., Nijhuis W.H., Hermida-Merino D., Portale G., Bomans P.H.H., Ottmann Ch., Friedrich H., Bras W., Akiva A., Orgel J.P.R.O., Meldrum F.C., Sommerdijk N. 2020. Intermolecular channels direct crystal orientation in mineralized collagen. Nature Commun. V. 11. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18846-2>

Morphogenesis of Osteoid Structures during Cultivation of Mesenchymic Stromal Cells on Fibrillary Collagen in the Presence of Silicoalumophosphate

A. A. Gaidash^{a, *}, M. I. Blinova^b, S. A. Aleksandrova^b, Y. A. Nashchekina^b, V. K. Krut'ko^a, O. N. Musskaya^a, K. V. Skrotskaya^c, A. V. Nashchekin^d, N. A. Mikhailova^b, and A. I. Kulak^a

^a Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^c Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, 220006 Belarus

^d Ioffe Physical-Technical Institute RAS, St. Petersburg 194021 Russia

*e-mail: aljack880@gmail.com

The effect of glass-crystalline material “Biosit-Sr Elkor” at the early stages of morphogenesis of osteoid structures in cultures of mesenchymal stromal cells of the bone marrow was studied. The maximum cultivation period is 28 days. Morphological studies were performed using scanning electron microscopy. It was found silicoaluminophosphate that accelerates the formation of osteoid structures, enhances the synthesis, compaction and mineralization of fibrillar collagen, activates matrix vesicles by hyperplasia, hypertrophy and excretion. During cultivation, glass-crystalline material partially dissolves and disintegrates, chemical agents with cross-linking, surface-active and mineralizing properties come out into the nutrient medium. The key mechanism for the compaction of collagen fibers is the cross-linking effect of siloxane bonds. Due to the action of surface-active agents, compacted collagen fibers are straightened and perforated with the formation of haversified lamellar structures — structural precursors of bone plates. The mineralizing effect is mediated by an increase in the homo- and heterogeneous nucleation of calcium phosphates, the deposition of mineral nodules in differentiating cells and in the fibers of the collagen substrate, which accelerates the aging of the cell culture. Conclusion: glass-crystalline material “Biosit-Sr Elkor” has a stimulating effect on the early stages of osteogenesis *in vitro*.

Keywords: bone marrow mesenchymal stromal cells, primary cell cultures, type I collagen, silicoaluminophosphates, osteogenesis, matrix vesicles, mineralization, calcium phosphates, bone plates

РЕАКЦИЯ CD68⁺, CD45RO⁺ И КАТЕХОЛАМИНСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ НА РАЗВИТИЕ ОПУХОЛИ В ТОЛСТОЙ КИШКЕ У ПОТОМСТВА СПЛЕНЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС-САМОК

© 2021 г. О. М. Арлашкина¹*, Г. Ю. Стручко¹, Л. М. Меркулова¹, М. Н. Михайлова¹

¹Кафедра нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией
Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, 428015 Россия

*E-mail: olgaruz1202@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2021 г.

После доработки 12.06.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

Глобальная проблема последних десятилетий — высокая распространенность иммунодефицитных состояний. Факторы, приводящие к иммунной недостаточности, многообразны, в том числе — удаление селезенки (спленэктомия), которая приводит к развитию постспленэктомического синдрома, характеризующегося проявлениями вторичного иммунодефицита и акцидентальной инволюцией тимуса. Это может негативно отражаться и на реактивности клеток иммунной системы потомства и увеличивать риск развития опухолей. Целью исследования явилось изучение реактивности популяций макрофагально-моноцитарного ряда (CD68⁺-клеток), Т-лимфоцитов (CD45RO⁺-клеток) и клеток, содержащих катехоламины, в селезенке потомства спленэктомированных крыс-самок в возрасте 3 и 6 мес. в ответ на развитие опухоли в толстой кишке. Объектом исследования служила селезенка. С помощью люминесцентно-гистохимических и иммуногистологических методов изучены особенности изменения числа CD68⁺-, CD45RO⁺-клеток и уровня биогенных катехоловых аминов. Показано, что у потомства спленэктомированных крыс на фоне низкого уровня катехоламинов в люминесцирующих структурах белой и красной пульпы селезенки реактивность клеток макрофагально-моноцитарной системы и Т-лимфоцитов селезенки на развитие опухоли в толстой кишке менее выражена, чем у потомства интактных крыс. Таким образом, течение беременности в состоянии иммунодефицита, вызванной спленэктомией, приводит к снижению уровня катехоламинов в селезенке потомства на фоне канцерогенеза, что сопровождается низкой реактивностью макрофагов и Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: иммунодефицит, канцерогенез, катехоламины, потомство, селезенка, спленэктомия, CD68⁺-клетки, CD45RO⁺-клетки

DOI: 10.31857/S0041377121050023

Глобальной проблемой последних десятилетий по-прежнему остается высокая распространенность иммунодефицитных состояний как у взрослых, так и у детей. Известно, что на фоне иммунодефицита значительно увеличивается риск развития злокачественных новообразований (Антонина и др., 2013; Князева и др., 2018; Венёв и др., 2019). Увеличение числа иммунодефицитов у детей первого года жизни указывает на причинную значимость факторов, действующих пренатально (Реутова, Дроздова, 2008; Слабкая и др., 2015). Имеются сведения о том, что течение беременности в состоянии недостаточности иммунной системы приводит к нарушению развития иммунных органов у плода (Рекалова, 2013).

Факторы, приводящие к нарушению иммунитета, многообразны (Хаитов, 2000). Среди них — оперативные вмешательства на селезенке (Ахметзянов, Гайнаншин, 2018). Известно, что удаление селезенки приводит к развитию широкого спектра осложнений (Uraski, 1982). Одним из наиболее опасных является постспленэктомический гипоспленизм, характеризующийся проявлениями вторичного иммунодефицита и акцидентальной инволюцией тимуса (Апарцин, 2000; Москвичев и др., 2012; Ахметзянов, Гайнаншин, 2018; Меркулова и др., 2018). Кроме того, есть сведения о том, что у спленэктомированных крыс-самок рождается потомство с признаками преждевременной инволюции тимуса (Драндрова и др., 2018).

Известно, что течение онкогенеза сопровождается не только количественными нарушениями компонентов адаптивного и врожденного иммунитета, но и изменениями некоторых функций иммунокомпетентных клеток (Хаитов, 2000; Богданова и др.,

Принятые сокращения: ДМГ — 1,2-диметилгидразин; ЛГК — люминесцирующие гранулярные клетки; МКАТ — моноклональные антитела; ПАЛМ — периаартериальные лимфоидные муфты; DAB — 3,3'-диаминобензидин.

2019). Важную роль в иммунных реакциях в селезенке играют субпопуляции CD68⁺- и CD45RO⁺-клеток. Белок CD68 экспрессирован на фагоцитирующих клетках – моноцитах крови и тканевых макрофагах (Шатских, Лузикова, 2012; Regh et al., 2012). Известно, что белок CD68 процессирует антиген путем постепенного ферментативного расщепления фагоцитируемых клеткой объектов, после чего презентует антиген лимфоцитам, а далее запускается антиген-зависимый иммунный ответ и миграцию лимфоцитов (Holness et al., 1993). В результате иммунного реагирования на тот или иной антиген в периферических органах иммунитета накапливаются клетки памяти В- и Т-типа. В периартериальных лимфоидных муфтах и периартериальной зоне лимфоидных узелков определяются CD45RO⁺-иммунореактивные клетки (Федоровская и др., 2012). CD45RO – это специфический маркер всех лимфоцитов, чаще идентифицируется как маркер наивных Т-клеток памяти (Сохоневич и др., 2015). Он больше экспрессируется в Т-зависимых зонах белой пульпы и значительно слабее – в красной пульпе на моноцитах, макрофагах и В-клетках.

Из литературы известно, что важную роль в регуляции деятельности клеток иммунной системы играют люминесцирующие гранулярные клетки и продуцируемые ими катехоламины – дофамин, норадреналин (Гордон, 1982). К настоящему времени доказано, что люминесцирующие гранулярные клетки селезенки участвуют в регуляции локальных механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки. К таким клеткам-регуляторам относятся люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка и красной пульпы (Гордон, 1982; Табаева, 2008; Мельникова, 2016).

Имеются сведения о том, что катехоламины способны оказывать различное влияние на лимфоциты и другие иммунокомпетентные клетки, что подтверждается наличием рецепторов к ним на лимфоидных клетках (Кузьмичева, Киселёва, 2004). В частности, показано, что норадреналин способен влиять на активность клеток макрофагально-моноцитарного ряда, усиливать дегрануляцию тучных клеток, стимулировать продукцию антител и повышать активность Т-хелперов (Гордон, 1982; Стручко, 2003).

Кроме того, в литературе имеются данные о том, что опухоль-ассоциированная иммунопатология, индуцированная введением 1,2-диметилгидразина (ДМГ), сопровождается развитием гипотрофических процессов в белой пульпе селезенки (Lisnychuk et al., 2018; Арлашкина и др., 2019). Однако в доступной литературе сведения о влиянии постспленэктомического синдрома на реакцию и взаимосвязь катехоламинов, клеток макрофагально-моноцитарного и лимфоидного происхождения в селезенке у потомства спленэктомированных крыс при 1,2-диметилгидразин-индуцированном канцерогенезе отсутствуют. Исходя из вышесказанного, исследование

реакции CD68⁺-клеток, относящихся к макрофагально-моноцитарному ряду и Т-лимфоцитов, несущих маркеры к CD45RO⁺, с учетом изменений уровня катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки у потомства крыс с вторичным иммунодефицитом на фоне канцерогенеза в толстой кишке, является весьма актуальным.

В настоящей работе поставлены следующие задачи: 1) оценить численность клеток макрофагально-моноцитарного (CD68⁺-клеток) и клеток лимфоидного происхождения (CD45RO⁺-клеток) в селезенке у потомства интактных и спленэктомированных крыс при индуцировании у него канцерогенеза в толстой кишке; 2) оценить изменения уровней катехоловых аминов в структурах селезенки и их взаимосвязь с изменениями числа исследуемых клеток на той же модели исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Эксперименты выполнены на 110 белых нелинейных крысах-самцах, которые были разделены на 3 группы: 1 – группа контроля, потомство интактных здоровых крыс ($n = 30$); 2 – потомство интактных крыс, которому вводили ДМГ ($n = 40$); 3 – потомство спленэктомированных самок, которому вводили ДМГ ($n = 40$). Все манипуляции с животными производили в соответствии с требованиями “Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах” (Директива 86/609/ЕЕС). Потомство интактных животных получали путем спаривания 4-месячных здоровых крыс-самок со здоровыми самцами. Для моделирования у крыс вторичного иммунодефицитного состояния проводили спленэктомию у крыс-самок (Стручко, 2003). Потомство спленэктомированных самок получали через спаривание спленэктомированных крыс-самок (через 1 мес. после операции по удалению селезенки) со здоровыми самцами.

Экспериментальная модель аденокарциномы толстой кишки. В качестве канцерогена использовали ДМГ (Acros organics, Бельгия) (Jacoby et al., 1991). Водный раствор ДМГ начинали вводить животным через 1 мес. после рождения внутрибрюшинно 1 раз в неделю в дозе 20 мг/кг в течение 1 мес., согласно известной модели (Jacoby et al., 1991). Выведение животных из эксперимента осуществляли путем декапитации по достижению ими возраста 3 и 6 мес. Объектом исследования служила селезенка. Использовали селезенку только тех крыс, у которых патоморфологически были подтверждены неопластические новообразования в толстой кишке. Срезы селезенки изучали разными методами.

Иммуногистохимия. Использовали моноклональные антитела к кластеру дифференцировки 68 типа (CD68), клон ED-1 (Santa Cruse. США) и к кластеру дифференцировки CD45RO, клон UCHL1 (Dako, Дания) (Kumar et al., 2011). Иммуногистохимиче-

ские реакции визуализировали с помощью оптической системы Leica ChromoPlex™ 1 Dual Detection for BOND (США). Чувствительность и специфичность иммуногистохимических реакций оценивали с помощью неиммунизированной кроличьей сыворотки. Положительной иммуногистохимической реакцией на антитела считали коричневую окраску мембраны клетки. С помощью МКАТ к CD68 идентифицировали клетки макрофагальной природы (Шатских, Лузикова, 2012; Regh et al., 2012), а с помощью МКАТ к CD45RO – лимфоциты, преимущественно наивные Т-клетки памяти (Сохоневич и др., 2015).

Морфометрия. Для оценки количественной характеристики иммуногистохимических реакций получали цифровые изображения микропрепаратов селезенки с помощью люминесцентного микроскопа Микромед 3 Люм (Россия), цифровой фотокамеры Canon DS126191 (Тайвань) и персонального компьютера. С помощью лицензионной программы “Микро-Анализ” (Санкт-Петербург, 2010) осуществляли количественную оценку интенсивности мембранных иммуногистохимических реакций. На каждом срезе измеряли не менее 10 интересующих полей зрения. Площадь мембранной иммуногистохимической реакции определяли посредством автоматического выделения интересующего цветового спектра (окрашенного DAB). Далее определяли долю окрашенного участка от площади всего снимка в %.

Визуализация катехоламинов. Идентификацию катехоламинов в структурах селезенки осуществляли с помощью люминесцентно-гистохимического метода Falk B., Hillarp N. (Falk et al., 1962, в модификации Крохиной и Александровой (1969)). Для выявления структур селезенки, содержащих катехоламины (дофамин, норадреналин) полученные криостатные срезы селезенки подвергали воздействию паров параформальдегида в течение 60 мин при температуре 80°C, после чего срезы высушивали в воздушной среде и заключались в полистирол. Готовые микропрепараты рассматривали под люминесцентным микроскопом Люмам-4 (Россия). Катехоламины обнаруживали по реакции конденсации формальдегидом с образованием конечных продуктов – 3,2-дигидроизохинолинов с ярко-зеленой флуоресценцией.

Уровень катехоламинов в аминокислотных структурах селезенки определяли цитоспектрофлуориметрически (Калмыков, 1982), использовали люминесцентный микроскоп Люмам-4 и фотонасадку ФМЭЛ-1А. Выходное напряжение составляло 600 В. Свет флуоресценции продуктов реакции катехоламинов на препарате, попадая в насадку, проходил через специальное отверстие (зонд) диаметром 0.5 мм, вырезающий в плоскости препарата область, проходящий через интерференционный светофильтр с определенной длиной волны. Использовали светофильтр № 6 с длиной волны пропускания 480 нм. Содержание биогенных катехоловых аминов в структурах селезенки оценивали в усл. ед. флуоресценции по

цифровым показаниям шкалы регистрирующего прибора-усилителя.

Статистическая обработка. Обработку цифровых данных проводили с помощью электронных таблиц Microsoft Office Excel 2016 и программы Statistica 8.0 (Stat Soft Inc.) с использованием стандартных методов параметрической и непараметрической статистики (Sokal, 1981). Тип распределения устанавливали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса (Siegel, 1988). Для описания данных применяли такие стандартные статистические показатели, как средняя арифметическая величина M и ее средняя ошибка m . Последующее множественное сравнение проводили с помощью LSD-критерия Фишера. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.01$ (Гублер, Генкин, 1973; Реброва, 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью иммуногистохимической обработки срезов селезенки моноклональными антителами к CD68 установлено, что большинство CD68⁺-клеток у потомства интактных крыс в возрасте 3 мес. локализованы в красной пульпе. Это мелкие клетки, расположенные чаще небольшими скоплениями в 1–2 слоя. У крыс в возрасте 6 мес. численность популяции CD68⁺-клеток в красной пульпе значительно не изменяется (рис. 1а). В периартериальных лимфоидных муфтах (ПАЛМ) CD68⁺-клетки представлены крупными клетками с интенсивным мембранным окрашиванием, расположенными в наружной зоне наибольшими скоплениями. В лимфоидных узелках – единичные CD68⁺-клетки с меньшим накоплением хромогена, но крупные и локализованы преимущественно на границе между центром размножения и зоной мантии. Их численность у 6-месячных крыс по сравнению с 3-месячными уменьшается практически вдвое ($p < 0.01$).

CD45RO⁺-клетки локализируются, преимущественно, группами в наружной зоне ПАЛМ. В основном, это Т-клетки памяти. Также встречаются единичные клетки в лимфоидных узелках и в красной пульпе. Число CD45RO-положительных клеток в ПАЛМ и в красной пульпе у крыс больше в возрасте 6 мес., чем в 3 мес. (рис. 1б). При параллельном люминесцентно-гистохимическом исследовании в селезенке выявляется специфическое свечение люминесцирующих гранулярных клеток (ЛГК) в темно-зеленой белой пульпе и более светлой оранжево-зеленой красной пульпе. В герминативном центре лимфоидного узелка люминесцирующие клетки имеют преимущественно округлую форму с яркой желто-белой люминесценцией, расположены компактно на границе с зоной мантии аналогично CD68⁺-клеткам. В ПАЛМ выявляются немногочисленные гранулярные клетки с неярым желтовато-оранжевым свечением, размер и форма которых

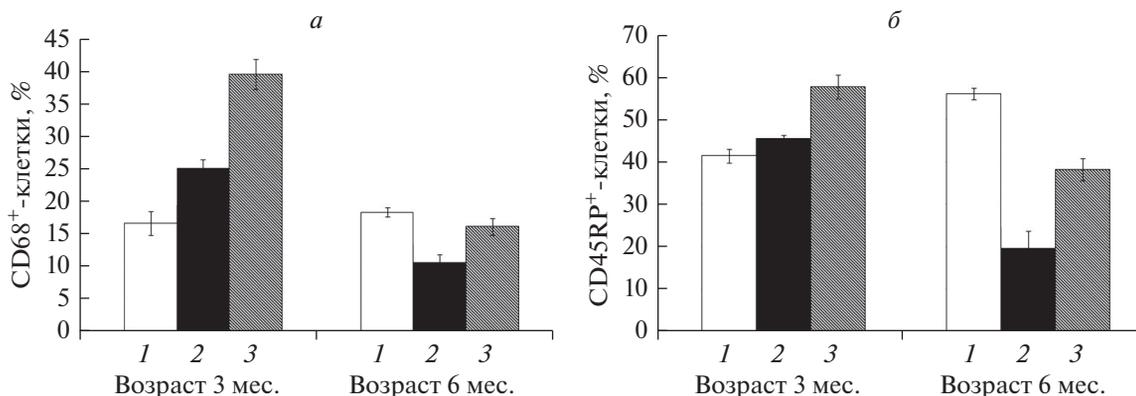


Рис. 1. Изменение численности CD68⁺-клеток в красной пульпе селезенки (а) и CD45RO⁺-клеток в периартериальных лимфоидных муфтах селезенки (б) у потомства от крыс интактных (1, 2) и спленэктомированных (3). Потомство: 1, 3 – интактное, 2 – интактное с введенным канцерогеном ДМГ.

сильно варьирует. Численность и локализация люминесцирующих клеток у крыс 3-х и 6-месячного возраста не различаются, однако у них изменяется содержание катехоламинов. Их уровень наиболее значительно увеличивается в структурах белой пульпы, а в красной пульпе, наоборот, уменьшается (табл. 1).

Введение ДМГ потомству интактных крыс привело к развитию у него небольших опухолевидных образований с умеренной дисплазией эпителия кишечных крипт в возрасте 3 мес. (через 1 мес. после окончания курса инъекций). А у крыс в возрасте 6 мес. (через 4 мес. после инъекций) в 85% случаев развивается аденокарцинома с высокой или умеренной степенью дифференцировки. У потомства спленэктомированных крыс в возрасте 3-х мес. после инъекций канцерогена была выявлена выраженная дисплазия эпителия кишечных крипт, а через 4 мес. у них в 100% случаев выявлялась аденокарцинома умеренной или низкой степени дифференцировки.

Исследовали селезенку только тех крыс, в толстой кишке которых были выявлены неопластические образования.

Развитие опухоли в толстой кишке у потомства интактных крыс привело к перераспределению субпопуляций CD68⁺- и CD45RO⁺-клеток в структурах селезенки. В возрасте 3 мес. в красной пульпе селезенки количество CD68⁺-клеток увеличивается у потомства интактных крыс на 51%, а у потомства спленэктомированных крыс – более чем в 2 раза (рис. 2б). Однако в возрасте 6 мес. численность этих клеток уменьшается с более низким значением у потомства интактных крыс (рис. 1а). Число CD68⁺-клеток в герминативном центре и ПАЛМ по сравнению с контролем значимо не изменяется. Изменения числа клеток, экспрессирующих CD45RO, имеют ту же направленность, что и изменения числа CD68⁺-клеток. Так, в 3 мес. численность CD45RO⁺-

Таблица 1. Уровень катехоламинов в люминесцирующих структурах селезенки крыс в возрасте 3-х и 6 мес. в контроле и после введения канцерогена ДМГ

Структура	Уровень катехоламинов, усл. ед. (<i>M ± m</i>)					
	контроль		потомство с введенным ДМГ от интактных крыс		потомство с введенным ДМГ от спленэктомированных крыс	
	3 мес.	6 мес.	3 мес.	6 мес.	3 мес.	6 мес.
ЛГК-ГЦ	168.5 ± 9.3	242.0 ± 22.5	70.2 ± 5.6 ^б	103.8 ± 7.2 ^б	157.7 ± 3.8	83.5 ± 5.2 ^б
МО-ГК-ГЦ	110.09 ± 7.9	171.3 ± 11.4	112.6 ± 2.4	59.5 ± 4.9 ^б	100.5 ± 1.2	44.6 ± 2.3 ^б
ЛГК-ПАЛМ	87.6 ± 3.9	114.1 ± 0.5	178.6 ± 7.2 ^б	265.1 ± 3.0 ^б	72.9 ± 1.8 ^б	47.6 ± 0.6 ^б
МО-ЛГК-ПАЛМ	47.6 ± 0.6	70.0 ± 10.9	47.3 ± 0.5	138.8 ± 16.9 ^а	35.3 ± 1.5	131.4 ± 12.2 ^б
ЛГК-КП	242.9 ± 24.9	199.8 ± 12.9	285.6 ± 2.3	73.7 ± 3.4 ^б	213.4 ± 26.1	73.3 ± 4.6 ^б
МО-ЛГК-КП	204.3 ± 23.2	195.8 ± 12.5	215.3 ± 23.5	53.1 ± 1.8 ^б	212.8 ± 8.5	41.3 ± 2.7 ^б

Примечание. ГЦ – герминативный центр, КП – красная пульпа, ЛГК – люминесцирующие гранулярные клетки, МО – микроокружение, ПАЛМ – периартериальные лимфоидные муфты. Различия по сравнению с группой контроля того же возраста достоверны при ^а*p* < 0.01 или ^б*p* < 0.001.

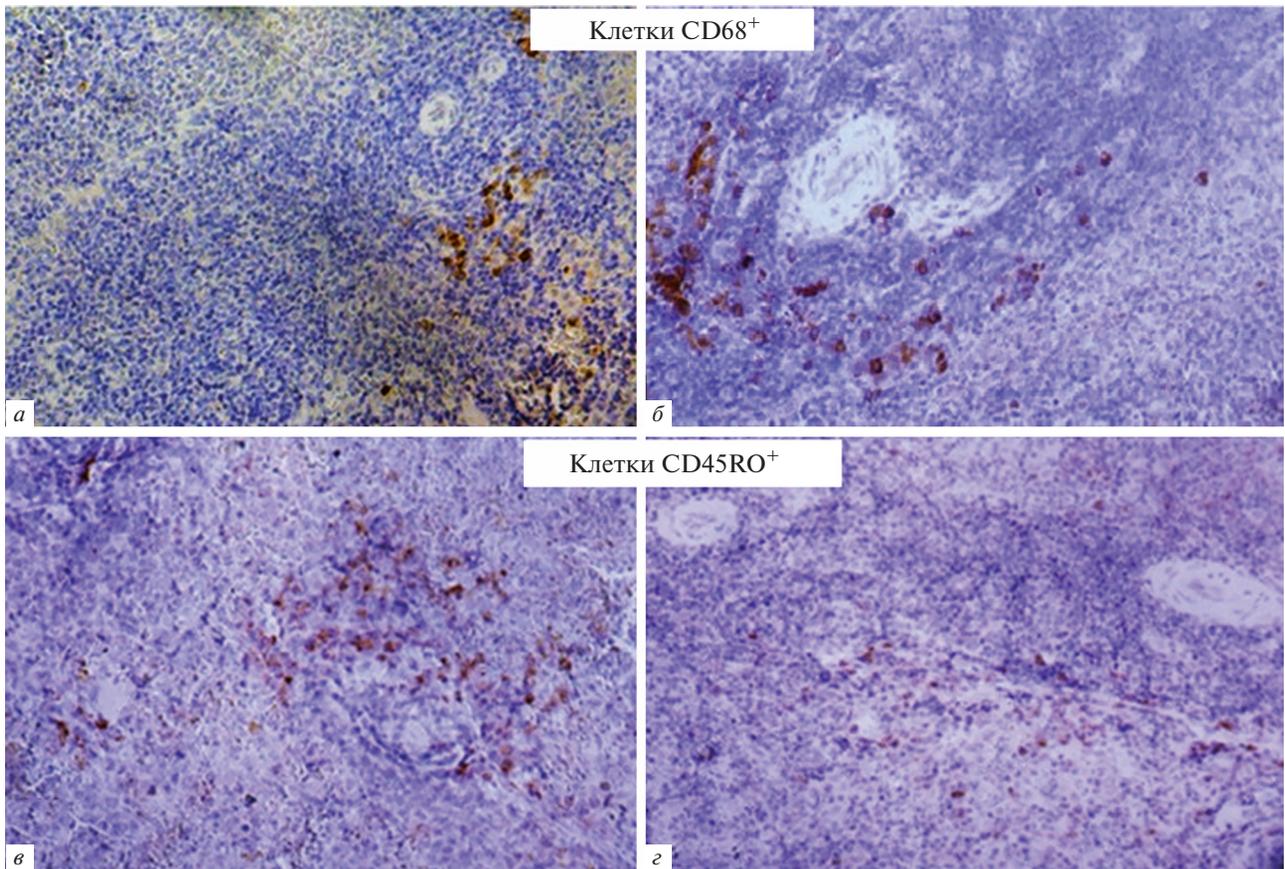


Рис. 2. Увеличение численности $CD68^+$ -клеток при развитии опухоли в толстой кишке у потомства спленэктомированных крыс в возрасте 3 мес. (*a, б*) и уменьшение численности $CD45RO^+$ -клеток при развитии той же опухоли у потомства intactных крыс в возрасте 6 мес. (*в, г*). Иммуноцитохимия. Клетки $CD68^+$ и $CD45RO^+$ окрашены коричневым цветом. *a* – потомство intactных крыс без воздействия; *б* – потомство спленэктомированных крыс, которому вводили канцероген ДМГ; *в* – потомство intactных крыс без воздействия; *г* – потомство intactных крыс, которому вводили ДМГ. Увел. об.: $40\times$.

клеток в ПАЛМ увеличивается у потомства intactных крыс на 10%, а у потомства спленэктомированных крыс – на 39%. В возрасте 6 мес., наоборот, происходит уменьшение числа $CD45RO^+$ -клеток: у потомства intactных крыс – на 64% (рис. 2*г*), а у потомства спленэктомированных крыс – всего на 31% (рис. 1*б*).

В ходе экспериментов было выявлено, что изменения числа клеток селезенки, экспрессирующих $CD68$ и $CD45RO$, сопровождаются изменением уровня катехоламинов в ЛГК и лимфоцитах их микроокружения. На фоне ДМГ-индуцированного канцерогенеза у потомства intactных крыс в возрасте 3 мес. происходит увеличение уровня катехоламинов в ПАЛМ в 2 раза, а в ЛГК герминативных центров, напротив, отмечается их 2-кратное уменьшение. При этом катехоламиновая обеспеченность лимфоцитов их микроокружения, а также красной пульпы остается такой же, как у контрольных крыс (табл. 1). На более позднем сроке канцерогенеза (у крыс в возрасте 6 мес.) уровень катехоламинов в ЛГК герминативных центров по сравнению с кон-

тролем также сокращается (в 2, 3 раза), в их микроокружении – практически в 3 раза. На этом сроке исследования в ПАЛМ (как в ЛГК, так и микроокружении) уровень катехоламинов так же, как и на раннем сроке канцерогенеза, остается повышенным в 2 раза, однако в красной пульпе уменьшается в 2.7 раз (табл. 1).

Таким образом, увеличение числа $CD68^+$ - и $CD45RO^+$ -клеток при канцерогенезе в толстой кишке у потомства intactных крыс в возрасте 3 мес. коррелирует с уменьшением уровня катехоламинов в ЛГК герминативных центров и с увеличением их содержания в ЛГК периартериальных лимфоидных муфт. Уменьшение числа $CD68^+$ -клеток в красной пульпе и сокращение численности $CD45RO^+$ -клеток в возрасте 6 мес. сопровождается уменьшением уровня катехоламинов в ЛГК и микроокружении герминативных центров и красной пульпы и в то же время – возрастанием уровня катехоламинов в ПАЛМ.

Развитие опухоли на фоне врожденного иммунодефицитного состояния сопровождается несколько

иными изменениями уровня катехоламинов в структурах селезенки. У 3-месячного потомства спленэктомированных крыс эти изменения в ЛГК в ПАЛМ носят противоположный характер по сравнению с таковыми показателями у потомства интактных крыс с ДМГ-индуцированным канцерогенезом (табл. 1), что сочетается с более значимым возрастанием числа CD45RO⁺-клеток у этой группы крыс. В других исследуемых структурах селезенки потомства спленэктомированных самок значения катехоламинов остаются на уровне контрольных показателей, что указывает на их низкую реактивность. В возрасте 6 мес. при канцерогенезе на фоне иммунодефицита уровень катехоламинов уменьшается практически во всех исследуемых структурах, при этом в ЛГК в ПАЛМ их изменение противоположно изменению аналогичного показателя у потомства здоровых крыс (табл. 1). Поскольку CD45RO⁺-клетки локализуются преимущественно в наружной зоне ПАЛМ на границе с красной пульпой, вероятно, на изменение числа этих клеток оказывают влияние катехоламины красной пульпы.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента была выявлена взаимосвязь изменений числа клеток макрофагально-моноцитарной природы (CD68⁺), лимфоидного происхождения (CD45RO⁺) и уровня катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении при развитии опухоли в толстой кишке. Было выявлено, что на ранних сроках онкогенеза у потомства интактных крыс (в возрасте 3 мес.) наблюдается увеличение числа CD68⁺-клеток в красной пульпе и CD45RO⁺-клеток в наружной зоне ПАЛМ, что, вероятно, можно расценивать как ответную реакцию этих клеток на антигенную стимуляцию при развитии опухоли в толстой кишке (Ato et al., 2004). На более позднем этапе онкогенеза (у крыс в возрасте 6 мес.) происходит уменьшение CD68⁺-клеток красной пульпы и CD45RO⁺-клеток ПАЛМ, что может свидетельствовать о миграции клеток из органа к растущей опухоли (Perse, Cerar, 2011). Известно, что на активность клеток макрофагально-моноцитарной природы и миграцию лимфоцитов способны влиять катехоламины (Кузьмичева, Киселёва, 2004). Нами экспериментально показано, что при росте числа клеток CD68⁺ и CD45RO⁺ у 3-месячных крыс снижается уровень катехоламинов в ЛГК герминативных центров и увеличивается их содержания в ЛГК в ПАЛМ, а в возрасте 6 мес. при уменьшении числа этих клеток, наоборот, происходит уменьшение уровня катехоламинов в ЛГК и микроокружении герминативных центров и красной пульпы и, в то же время, параллельно возрастает их уровень в ПАЛМ.

Исследование показало, что у потомства спленэктомированных крыс при развитии опухоли тол-

стой кишки отмечаются несколько иные изменения в реакции клеток макрофагально-моноцитарной природы и Т-лимфоцитов, а также катехоламинового обеспечения клеток и паренхимы селезенки. Так, уровень катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках ПАЛМ уменьшается и в возрасте 3 мес., и более значимо в возрасте 6 мес., что ведет к недостаточной реактивности и уменьшению миграции к опухоли CD68⁺- и CD45RO⁺-клеток (Ato, 2004; Perse, Cerar, 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у потомства спленэктомированных крыс в селезенке наблюдается менее выраженная, чем у потомства интактных крыс, реактивность клеток макрофагально-моноцитарной системы и Т-лимфоцитов в ответ на развитие опухоли в толстой кишке. Важную роль при этом играют катехоламины. По нашему мнению, ведущим патогенетическим звеном недостаточной реактивности клеток селезенки является напряжение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (Стручко и др., 2011), ускорение процессов инволюции тимуса и уменьшение миграции Т-лимфоцитов в селезенку, что, в конечном итоге, может привести к усугублению опухолевой прогрессии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями “Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах” (Директива 86/609/ЕЕС) и приказом Министерства здравоохранения РФ № 26Э от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики”. Исследование единогласно одобрено на заседании Локального этического комитета медицинского факультета Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова (протокол № 20-01 от 29.01.2020 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.М. Арлашкина: сбор и обработка материала, статистическая обработка и написание текста; Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова: концепция и дизайн исследования, редактирование; М.Н. Михайлова: сбор и обработка материала, редактирование текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Апарцин К.А., Григорьев Е.Г., Коган А.С.* 2000. Аутоотрансплантация ткани селезенки при вынужденной спленэктомии в условиях хирургической инфекции живота. Хирургия тяжелых гнойных процессов. Новосибирск: Наука. Гл. 8. С. 193. (*Apartsin K.A., Grigor'ev E.G., Kogan A.S.* 2000. Spleen tissue autotransplantation during forced splenectomy under conditions of surgical infection of the abdomen. Surgery of severe purulent processes. Novosibirsk: Science. Ch. 8. P. 193.)
- Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П.* 2013. Иммунофенотип синдрома вторичного иммунодефицита при раке яичников. Медицинский альманах. Т. 29. № 5. С. 77. (*Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P.* 2013. Immunophenotype of secondary immunodeficiency syndrome in ovarian cancer. Med. Almanac. V. 29. № 5. P. 77.)
- Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н.* 2019. Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомизированных крыс разных возрастных периодов после введения 1,2-диметилгидразина. Клиническая и экспериментальная морфология. Т. 8. № 4. С. 49. (*Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Mikhailova M.N.* 2019. Changes in the white pulp of the spleen in the offspring of splenectomized rats of different age periods after administration of 1,2-dimethylhydrazine. Clinical Exper. Morphol. V. 8. № 4. P. 49.) <https://doi.org/10.31088/CEM2019.8.4.49-58>
- Ахметзянов Ф.Ш., Гайнанишин Р.Р.* 2018. Клеточные и гуморальные изменения после спленэктомии. Казанский медицинский журнал Т. 99. № 5. С. 802. (*Akhmetzyanov F.Sh., Gainanshin R.R.* 2018. Cellular and humoral changes after splenectomy. Kazan Med. J. V. 99. № 5. С. 802.) <https://doi.org/10.17816/KMJ2018-802>
- Богданова И.М., Болтовская М.Н., Рахмилевич А.Л., Артемьева К.А.* 2019. Ключевая роль опухоль-ассоциированных макрофагов в прогрессии и метастазировании опухолей. Иммунология. Т. 40. № 4. С. 41. (*Bogdanova I.M., Boltovskaya M.N., Rakhmylevich A.L., Artemyeva K.A.* 2019. The key role of tumor-associated macrophages in tumor progression and metastasis. Immunology. V. 40. № 4. P. 41.)
- Венёв Д.А., Дерипана Е.В., Ронпельт А.А., Лаберко А.Л., Абрамов Д.С., Варламова Т.В., Мухина А.А., Балашов Д.Н., Щербина А.Ю.* 2019. Лимфома как редкое осложнение тяжелой комбинированной иммунной недостаточности. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. Т. 18. № 1. С. 104. (*Venev D.A., Deripana E.V., Roppelt A.A., Laberko A.L., Abramov D.S., Varlamova T.V., Mukhina A.A., Balashov D.N., Shcherbina A.Yu.* 2019. Lymphoma as a rare complication of severe combined immune deficiency. Issues Hematol. Oncol. Immunopathol. Pediatrics. V. 18. № 1. P. 104.)
- Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Зеленова И.Г.* 1982. Нейротрансмиттеры лимфоидных органов. М.: Наука. (*Gordon D.S., Sergeeva V.E., Zelenova I.G.* 1982. Neurotransmitters of Lymphoid Organs. Moscow: Nauka.)
- Гублер Е.В., Генкин А.А.* 1973. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. Москва: Медицина. (*Gubler E.V., Genkin A.A.* 1973. Application of criteria for nonparametric statistics to assess the differences between two groups of observations in biomedical research. Moscow: Meditsina.)
- Драндрова Е.Г., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В.* 2018. Морфология тимуса при экспериментальном канцерогенезе потомства самок с вторичным иммунодефицитом. Чебоксары: Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова. 140 с. (*Drandrova E.G., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Moskvichev E.V.* 2018. Morphology of the thymus in experimental carcinogenesis of the offspring of females with secondary immunodeficiency. Cheboksary: Chuvashskiy gosudarstvennyy universitet imeni I.N. Ul'yanova. 140 p.)
- Калмыков В.Л.* 1982. Современные методы количественного определения катехоламинов и серотонина. Лечебное дело. № 7. С. 31. (*Kalmykov V.L.* 1982. Modern methods for the quantitative determination of catecholamines and serotonin. Lechebnoe Delo. № 7. P. 31.)
- Князева О.А., Уразаева С.И., Усачев С.А., Конкина И.Г.* 2018. Влияние глюкагонов 3D-металлов на поглощательную и метаболическую активность фагоцитов при экспериментальном иммунодефиците. Современные проблемы науки и образования. № 4. С. 205. (*Knyazeva O.A., Urazaeva S.I., Usachev S.A., Konkina I.G.* 2018. Influence of 3D-metal glucagons on the absorption and metabolic activity of phagocytes in experimental immunodeficiency. Modern Problems Sci. Edu. № 4. P. 205.)
- Крохина Е.М., Александрова П.Н.* 1969. Симпатический (адренергический) компонент эффекторной иннервации сердечной мышцы. Кардиология. № 3. С. 97. (*Krokhina E.M., Alexandrova P.N.* 1969. Sympathetic (adrenergic) component of the effector innervation of the heart muscle. Kardiologiya. № 3. P. 97.)
- Кузьмичева Л.В., Киселева Л.В.* 2004. Адаптационные возможности иммунокомпетентных клеток. Саранск: Издательство Мордовского университета. 180 с. (*Kuzmicheva L.V., Kiseleva L.V.* 2004. Adaptive capabilities of immunocompetent cells. Saransk: Publishing house of the Moravian University. 180 p.)
- Мельникова О.В.* 2016. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристики селезенки при поступлении солей кальция с питьевой водой. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 20 с. Оренбург. (*Melnikova O.V.* 2016. Morphological and immunohistochemical characteristics of the spleen upon intake of calcium salts with drinking water: Abstract of Ph.D. Thesis. 20 p. Orenburg.)
- Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Драндрова Е.Г., Михайлова М.Н.* 2018. Морфологическое исследование тимуса потомства крыс при экспериментальном канцерогенезе на фоне иммунодефицитной беременности самок. Морфология. Т. 153. № 3. С. 181. (*Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Drandrova E.G., Mikhailova M.N.* 2018. Morphological study of the thymus of rat offspring during experimental carcinogenesis against the background of immunodeficient pregnancy in females. Morphology. V. 153. № 3. P. 181.)
- Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н., Кострова О.Ю.* 2012. Иммуногистохимическая характеристика акцидентальной инволюции после спленэктомии. Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. Т. 7. № 12. С. 40. (*Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Mikhailova M.N., Kostrova O.Yu.* 2012. Immunohistochemical characterization of accidental involution of the thymus after splenectomy. Bulletin of Pyrogov Nat. Med. Surgical Center. V. 7. № 12. P. 40.)

- Реброва О.Ю. 2002. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера. (Rebrova O.Yu. 2002. Statistical Analysis of Medical Data. Application of the STATISTICA application package. Moscow: Publishing Media Sphere.)
- Рекалова Е.М. 2013. Механизмы формирования вторичной иммунной недостаточности и возможности ее коррекции. Астма та алергія. № 1. С. 13. (Rekalova E.M. 2013. Mechanisms of the formation of secondary immune deficiency and the possibility of its correction. Asthma and Allergies. № 1. P. 13)
- Реутова Е.А., Дроздова Е.А. 2008. Основные морфологические и морфометрические изменения показателей селезенки в системе “мать–плод” в условиях коррекции. Вестник Красноярского государственного аграрного университета. № 3. С. 245. (Reutova E.A., Drozdova E.A. 2008. Main morphological and morphometric changes in spleen indices in the mother-fetus system under conditions of correction. Bull. Krasnoyarsk State Agrarian University. № 3. P. 245.)
- Слабкая Е.В., Сазоненкова Л.В., Андреевкова Ю.С., Мешкова Р.Я. 2015. Клинические особенности селективной недостаточности IgG у детей младшего возраста. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. Т. 14. № 3. С. 27. (Slabkaya E.V., Sazonenkova L.V., Andreenkova Yu.S., Meshkova R.Ya. 2015. Clinical features of selective IgG deficiency in young children. Bull. Smolensk State Med. Acad. V. 14. № 3. P. 27.)
- Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А. 2015. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти. Цитология. Т. 57. № 5. С. 311. (Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A. 2015. Phenotypic characteristics and functional characteristics of T and B cells of immune memory. Tsitologiya. V. 57. № 5. P. 311.)
- Стручко Г.Ю. 2003. Морфофункциональное исследование тимуса и иммунобиохимических показателей крови после спленэктомии и иммунокоррекциию. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. 40 с. Саранск. (Struchko G.Yu. 2003. Morphofunctional study of the thymus and immunobiochemical parameters of blood after splenectomy and immunocorrection. Doctor Thesis. 40 p. Saransk.)
- Стручко Г.Ю., Меркулова М.Н., Москвичев Е.В., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Драндрова Е.Г., Мухаммад З. 2011. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика опухолей желудочно-кишечного тракта на фоне иммунной недостаточности. Вестник Чувашского университета. № 3. С. 450. (Struchko G.Yu., Merkulova M.N., Moskvichev E.V., Kostrova O.Yu., Mikhaylova M.N., Drandrova E.G., Mukhammad Z. 2011. Morphological and immunohistochemical characteristics of tumors of the gastrointestinal tract against the background of immune deficiency. Bull. Chuvash University. № 3. P. 450.)
- Табеева Н.Н. 2008. Люминесцентно-гистохимический анализ биоаминсодержащих структур селезенки при ауто- и изотрансплантации костного мозга. Автореф. канд. дисс. 20 с. Саранск. (Tabaeva N.N. 2008. Luminescence-histochemical analysis of bioamine-containing structures of the spleen during auto- and isotransplantation of bone marrow. Abstract of Ph.D. Thesis. 20 p. Saransk.)
- Федоровская Н.С., Дьяконов Д.А., Федоровская Н.С. 2012. Изменения микроциркуляции селезенки у больных иммунной тромбоцитопенией. Гематология и трансфузиология. Т. 57. № S3. С. 83. (Fedorovskaya N.S., Dyakonov D.A., Fedorovskaya N.S. 2012. Changes in spleen microcirculation in patients with immune thrombocytopenia. Hematol. Transfusiol. V. 57. № S3. P. 83.)
- Хаитов Р.М., Игнат'ева Г.А., Сидорович И.Г. 2000. Иммунология: учебник. Москва: Медицина. 432 с. (Khaitov P.M., Ignat'eva G.A., Sidorovich I.G. 2000. Immunology: Textbook. Moscow: Medicine. 432 p.)
- Шатских О.А., Лузикова Е.М. 2012. Морфофункциональная реакция натуральных киллеров и макрофагов селезенки на введение мелатонина животным, содержащимся при различных световых режимах. Морфология. Т. 141. № 1. С. 43. (Shatskikh O.A., Luzikova E.M. 2012. Morphofunctional response of natural killer cells and macrophages of the spleen to the introduction of melatonin to animals kept under different light conditions. Morphology. V. 141. № 1. P. 43.)
- Kumar G.L., Rudbeck L. (Eds.). 2011. Иммуногистохимические методы: руководство. М.: ЗАО АМТЕО-М. 224 с. (Kumar G.L., L. Rudbeck (Eds.). 2009. Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 172 p.)
- Ato M., Nakano H., Kakiuchi T., Kaye P. 2004. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands. J. Immunol. V. 173. P. 4815.
- Lisnychuk N., Soroka Y., Andrijchuk I. 2018. Histological changes in spleen under condition of toxic carcinogenesis. Georgian Med. News. № 280–281. P. 160.
- Holness C.L., R.P. do Silva, Fawcett J. 1993. Macrosialin, a mouse macrophage – restricted glycoprotein, is a member of the lamp. J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9661.
- Jacoby R.F., Llor X., Teng B.B., Davidson N.O., Brasitus T.A. 1991. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. J. Clin. Invest. V. 87. P. 624.
- Falk B., Hillarp N.A., Thieme G. 1962. Fluorescence of catechol-amines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. V. 10. P. 348.
- Perse M., Cerar A. 2011. Morphological and molecular alterations in 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. J. Biomed. Biotechnol. V. 2011. P. 14.
- Regh J.E., Bush D., Ward J.M. 2012. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. Toxicolopathol. V. 40. P. 345. <https://doi.org/10.1177/0192623311430695>
- Siegel S., Castellan Jr. 1988. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. N.Y.: McGrawHill, 2nd Edition.
- Sokal R. 1981. The principles and practice of statistics in biological research. N.-Y.: W.H. Freeman and Company, Biometry. 859 p.
- Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Sergeeva V.E., Stomenskaya I.S. 2000. Response of bioamine-containing rat thymic structures to experimental removal of the spleen. Immunol. (Moscow). V. 21. № 2. P. 13.
- Uraski U. 1982. Splenektomia w swiete wspoezecznych pogladow. Polski Tigodnik Lekarski. V. 37. P. 1109.

Reaction of Cd68⁺, Cd45RO⁺, and Catecholamine-Containing Spleen Cells to the Development of a Colon Tumor in the Offspring of Splenectomized Rat Females

O. M. Arlashkina^{a, *}, G. Yu. Struchko^a, L. M. Merkulova^a, and M. N. Mikhailova^a

^a Ulyanov Chuvash State University. Department of Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, Cheboksary, 428015 Russia

*e-mail: olgaruz1202@mail.ru

The global problem of recent decades is the high prevalence of immunodeficiency states. The factors leading to immune deficiency are manifold. One of them is removal of the spleen. It was shown that splenectomy leads to the development of post-splenectomy syndrome. It is characterized by manifestations of secondary immunodeficiency and accidental involution of the thymus. This can negatively affect the reactivity of the cells of the offspring's immune system. The aim of the research was to study the reactivity of populations of CD68⁺, CD45RO⁺, and cells containing catecholamines in the spleen of the offspring of splenectomized female rats at the age of 3 and 6 months in response to tumor development in the colon. It was shown that in the offspring of splenectomized rats against the background of a low level of catecholamines in the luminescent structures of the white and red pulp of the spleen, the reactivity of cells of the macrophage-monocytic system and spleen T-lymphocytes to tumor development in the colon is less pronounced than in the offspring of intact rats. Thus, the course of pregnancy in a state of immunodeficiency caused by splenectomy leads to a decrease in the level of catecholamines in the spleen of the offspring against the background of carcinogenesis, which is accompanied by low reactivity of macrophages and T-lymphocytes.

Keywords: immunodeficiency, carcinogenesis, catecholamines, offspring, spleen, splenectomy, CD68⁺-cells, CD45RO⁺-cells

УДК 577.352.465

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ ENaC В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. А. В. Сударикова^{1, *}, В. И. Чубинский-Надеждин¹, В. Ю. Васильева¹, Д. В. Лыскова^{1, 2}, М. А. Шорохова¹, Е. А. Морачевская¹, Ю. А. Негуляев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

*E-mail: anastasia.sudarikova@gmail.com

Поступила в редакцию 25.06.2021 г.

После доработки 09.07.2021 г.

Принята к публикации 10.07.2021 г.

Работа направлена на выявление функциональной активности натриевых каналов ENaC в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (эмСК). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток показало наличие основной порообразующей альфа-субъединицы ENaC в эмСК. Для электрофизиологического исследования натриевых каналов и анализа эффектов потенциальных активаторов ENaC использовали возможности регистрации унитарных токов при отведении от участка плазматической мембраны нативной клетки (вариант cell-attached). В экспериментах на эмСК обнаружена фоновая активность натриевых каналов и показана их активация при разборке актинового цитоскелета в ответ на подачу цитохалазина Д; оценены функциональные свойства одиночных каналов. Типичную активность каналов наблюдали также при добавлении к наружной стороне мембранного фрагмента трипсина (сериновой протеазы), известного стимулятора каналов ENaC. Вольтамперные характеристики натриевых каналов, активированных при действии деструктора цитоскелета или внеклеточной протеазы, были близки: проводимость составляла 11–13 пСм. Таким образом, выявлены физиологические пути стимуляции натриевых каналов ENaC в стволовых клетках эндометрия человека. Обнаруженные внутриклеточные и внеклеточные механизмы регуляции каналов ENaC могут обеспечивать быстрые изменения натриевой проницаемости плазматической мембраны стволовых клеток.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки человека, патч-кламп, плазматическая мембрана, натриевые каналы ENaC, актиновый цитоскелет

DOI: 10.31857/S0041377121050126

Изменения проницаемости плазматической мембраны нативных клеток для ионов натрия играют ведущую роль в регуляции водно-солевого баланса и клеточного объема. В различных электроневозбудимых клетках транспорт натрия из внеклеточной среды в цитоплазму связан с функциональной активностью эпителиальных натрий-проводящих каналов семейства ENaC (epithelial sodium channels), экспрессия которых, как теперь установлено, не является эксклюзивной особенностью апикальных мембран реабсорбирующего эпителия почек (Mirshahi et al., 1998; Сударикова и др., 2012; Sudarikova et al., 2015; Kleyman, Eaton, 2020). Потенциал-независимые каналы ENaC являются гетеротримерами и состоят из альфа-, бета- и гамма-субъединиц, в некоторых случаях дельта-субъединица может заменять субъединицу альфа. В клетках и тканях различной специализации, в том числе стволовых клетках, показана экспрессия субъединиц ENaC (Сударикова и др., 2012; Sudarikova et al., 2015; Petrik et al., 2018; Nam et al., 2020). Выявлены важнейшие внутриклеточные ме-

ханизмы регуляции натриевых каналов, связанные с организацией и динамикой актинового цитоскелета. В частности, показана их активация в ответ на разборку микрофиламентов при действии цитохалазина Д (Чубинский-Надеждин и др., 2013; Negulyaev et al., 2000; Shumilina et al., 2003; Sudarikova et al., 2015; Morachevskaya, Sudarikova, 2021). Обнаружена активация натриевых каналов при внеклеточном приложении сериновой протеазы трипсин (Sudarikova et al., 2019), специфического активатора каналов ENaC (Kleyman, Eaton, 2020). Накапливаются данные, свидетельствующие о вероятном вовлечении каналов ENaC в процессы механотрансдукции, опосредующие их вклад в регуляцию дифференцировки и пролиферации стволовых клеток (Petrik et al., 2018; Nam et al., 2020).

Перспективным объектом исследований в области механобиологии мезенхимных стволовых клеток человека являются стволовые клетки эндометрия (Сударикова и др., 2019; Чубинский-Надеждин и др., 2020), важным преимуществом которых считаются не-

ивазивные протоколы их получения (Земелько и др., 2011; Vanu et al., 2008; Chen et al., 2019). Ранее в наших исследованиях изучена механозависимая активация катионных каналов в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (ЭМСК) в ответ на локальное растяжение участка мембраны (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017, 2019). Обнаружен и изучен феномен функционального сопряжения активности кальций-проводящих механочувствительных каналов и кальций-управляемых калиевых каналов в плазматической мембране ЭМСК. С помощью электрофизиологических подходов установлено, что строго локализованный вход кальция в процессе механотрансдукции стимулирует активность кальций-зависимых калиевых каналов ВК в эндометриальных стволовых клетках (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017, 2019).

Вопросы, касающиеся функциональной экспрессии и возможностей активации каналов ENaC в мембране ЭМСК, ранее оставались вне специального рассмотрения и практически не изучены, что и определило цели и задачи настоящей работы. Основная экспериментальная задача заключалась в выяснении наличия в стволовых клетках эндометрия человека функционально-активных натриевых каналов и выяснения, принадлежат ли они к семейству ENaC. Использовали известные методические подходы и агенты, индуцирующие активацию этих каналов. Проведенная работа демонстрирует возможности использования специфических активаторов каналов для решения задач по функциональной идентификации ENaC в различных типах клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. Линии мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (ЭМСК) были получены из десквамированного эндометрия в менструальной крови здоровых доноров (линии 2304, 2804) и охарактеризованы (Земелько и др., 2011) в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали по стандартному протоколу в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (NuClone, США), 1% антибиотика-антимикотика и 1% GlutaMAX (Gibco, США), при 37°C и 5% CO₂. Использовали клетки с 5 по 16 пассаж. За 1–2 сут до электрофизиологических или флуоресцентных экспериментов клетки высевали на покровные стекла размером 4 × 4 и 12 × 12 мм соответственно.

Электрофизиология. Для регистрации токов через одиночные ионные каналы на участке мембраны неповрежденной клетки использовали конфигурацию cell-attached метода патч-кламп. Электрофизиологическая установка включала усилитель AxoPatch 200B и аналогово-цифровой преобразователь Axon Digidata 1550A (Molecular Devices Corp., США), управляемые программным обеспечением pClamp 10.5. Пипетки изготавливали из стандартных стеклянных за-

готовок на микрокузнице P-97 (Sutter Instrument, США), заполняли наружным раствором, содержащим (мМ): 145 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES/TrisOH; сопротивление пипеток составляло 5–12 МОм. Стандартный внеклеточный раствор в камере в экспериментах cell-attached содержал (мМ): 145 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES/TrisOH; pH всех растворов составлял 7.3. Подробное описание метода патч-кламп приведено в опубликованных ранее работах (например: Васильева, Чубинский-Надеждин, 2021).

С помощью амплитудных гистограмм, описанных функцией Гаусса, рассчитывали амплитуду одиночного открывания канала, которая соответствовала расстоянию между пиками. Вероятность открытого состояния канала P_o оценивали как $P_o = I/Ni$, где I – средний ток в определенном интервале времени (из амплитудных гистограмм), N – число работающих каналов в патче, i – средний ток через открытый канал.

Флуоресцентная микроскопия. Для определения присутствия альфа-субъединицы ENaC клетки промывали однократным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре, пермеабелизировали (0.25%-ным Tween-20, 10 мин) и инкубировали в растворе PBS, содержащем 10% козьей сыворотки (goat serum) в течение 1 ч для блокирования неспецифического присоединения антител к клеткам. Окраску первичными антителами к альфа-hENaC (StressMarq, США; разведение 1 : 200) проводили согласно стандартному протоколу (ночь при 4°C). Далее клетки инкубировали с вторичными козьими антителами против иммуноглобулина кролика, конъюгированными с флуоресцентным красителем Cy3 (Goat-Anti-Rabbit-Cy3; Santa Cruz, США; разведение 1 : 200, 1 ч в темноте), ядра окрашивали с помощью DAPI (10 мин в темноте).

Фибриллярный (F) актин в клетках ЭМСК окрашивали TRITC-фаллоидином (Sigma-Aldrich, США) с использованием стандартной процедуры. Покровные стекла с клетками промывали 1-кратным PBS, фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида, как описано выше, пермеабелизировали 0.1%-ным Тритоном X-100 (10 мин) и инкубировали в растворе PBS, содержащем 0.5 мкМ TRITC-фаллоидин (15 мин, 37°C), ядра окрашивали DAPI в течение 10 мин в темноте.

Между всеми процедурами флуоресцентного мечения альфа-hENaC и F-актина проводили двух- или трехкратные промывки препаратов PBS. После окрашивания препараты монтировали на предметных стеклах с использованием реагента, препятствующего выгоранию флуоресцентных красителей (vectashield anti-fading reagent; Vector Labs, США). Все изображения получали в ЦКП Института цитологии РАН на конфокальных микроскопах Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmBH, Германия) или

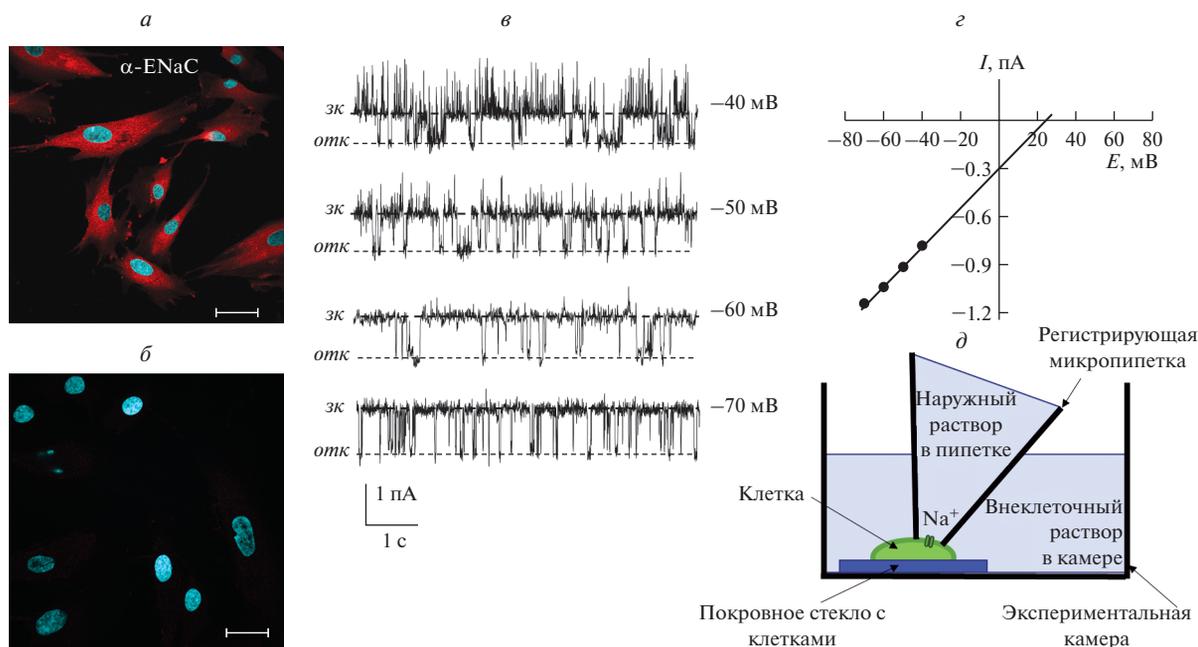


Рис. 1. Потенциал-независимые натриевые каналы в эМСК. *a* – Иммунофлуоресцентное окрашивание альфа-субъединиц канала ENaC (красный сигнал красителя Cy3) и ядер (синий сигнал DAPI); *б* – контрольный эксперимент (с инкубацией клеток только со вторичными антителами). Увел. объектива: 40×, масштабная линейка: 50 мкм. *в* – Фоновая активность натриевых каналов в участке мембраны нативной клетки (конфигурация cell-attached, токи входящего направления); здесь и далее поддерживаемые потенциалы указаны справа от записей токов: *зк* – закрытое состояние (уровень нулевого тока), *отк* – открытое состояние канала; при потенциалах –40 и –50 мВ отчетливо видна активность калиевых каналов (токи выходящего направления, открывания вверх от уровня нулевого тока, *зк*). *з* – Соответствующая вольтамперная характеристика; *д* – схема эксперимента по регистрации токов в конфигурации cell-attached метода патч-кламп. Пипетка плотно прижимается к участку клетки, образуя гигаомный контакт. Составы растворов см. в разделе “Материал и методика”.

Olympus FV3000 (Olympus, Япония) с использованием объектива 40× с масляной иммерсией. Обработку изображений проводили с помощью программных пакетов Leica LAS AF Lite и Image J.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Одними из возможных участников, вовлеченных в поддержание клеточного объема и ионного гомеостаза в эМСК, могут выступать натрий-проводящие каналы ENaC. Для того, чтобы исследовать функциональную экспрессию ENaC в эМСК, мы использовали иммунофлуоресцентную микроскопию и метод патч-кламп. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток специфическими антителами подтвердило наличие основной поробразующей альфа-субъединицы ENaC в эМСК (рис. 1*a, б*).

В конфигурации cell-attached метода патч-кламп регистрировали токи через одиночные каналы в стволовых клетках при значениях поддерживаемого потенциала на мембране в диапазоне от –80 до 0 мВ; ион натрия (145 мМ NaCl) являлся основным катионом в наружном растворе (в пипетке). В части экспериментов наблюдали токи выходящего направления (открывания вверх от уровня нулевого тока, см. рис. 1*в*), предположительно калиевых каналов (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017, 2019). Рис. 1*в* демонстрирует

пример фоновой активности сразу двух типов катионных каналов – калиевых (выходящие токи) и натриевых (входящие токи) – в участке мембраны нативной клетки (cell-attached). Входящие токи, отражающие фоновую активность натрий-проводящих каналов в мембране эМСК, были обнаружены, как минимум, в 7 случаях из общего числа экспериментов 46. Эта оценка может быть занижена, поскольку в экспериментах с высоким уровнем активности калиевых каналов регистрация другого типа каналов может быть затруднена. Не было выявлено существенной зависимости уровня активности каналов от клеточного пассажа (длительности культивирования). Проводимость исследуемых каналов составила 11–13 пСм, потенциал реверсии – около 20 мВ (рис. 1*з*), что характерно для потенциал-независимых натриевых каналов ENaC, ранее описанных нами в клетках различной специализации, включая клетки крови и культивируемые фибробласты (Ведерникова и др., 1999; Сударикова и др., 2012; Чубинский-Надеждин и др., 2013; Sudarikova et al., 2015).

В следующих сериях экспериментов cell-attached исследовали действие известных активаторов ENaC (цитохалазина Д и сериновой протеазы трипсина) на ионные токи в мембране эМСК. Действие цитохала-

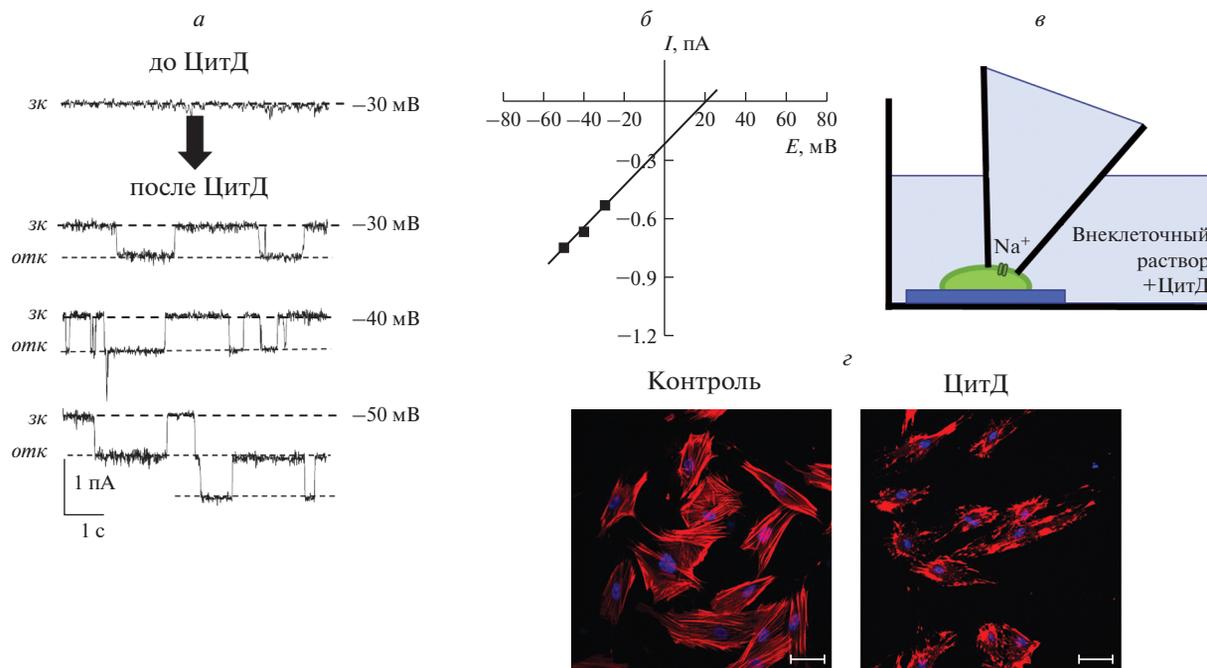


Рис. 2. Активация натриевых каналов, индуцированная разборкой актиновых филаментов при действии цитохалазина Д (ЦитД). *а* – Записи токов до (контроль) и через 3 мин после подачи 10 мкг/мл ЦитД во внеклеточный раствор в камере, *б* – соответствующая вольтамперная характеристика. *в* – Схема эксперимента. *г* – Окраска F-актина в эМСК в контрольных условиях и после обработки ЦитД; масштабная линейка: 50 мкм.

зина Д (10 мкг/мл), мембранопроникающего деструктора F-актина, тестировали на стабильных патчах, в которых фоновая активность каналов была минимальной или отсутствовала. Добавление цитохалазина Д во внеклеточный раствор в камере приводило к развитию активности натриевых каналов (рис. 2*а, б, в*) с проводящими характеристиками, близкими к измеренным в случае фоновой активности (см. рис. 1*в, г*); отмечена вариабельность кинетического поведения одиночных каналов. Активацию наблюдали в 17% случаев ($n = 18$) через 2–3 мин после подачи цитохалазина. Влияние цитохалазина Д на актиновый цитоскелет в эМСК было подтверждено с помощью окраски F-актина и представлено на рис. 2*г*. В контрольных условиях выявляются фибриллярные структуры цитоскелета, в то время как обработка цитохалазином (10 мкг/мл, 15 мин) приводила к нарушению организации микрофиламентов и появлению скоплений аморфного актина.

Эксперименты с ЦитД подтвердили, что в эМСК наблюдается характерный для ENaC механизм внутриклеточной регуляции, связанный с динамикой актинового цитоскелета, (Karpushev et al., 2010; Sudarikova et al., 2015; Morachevskaya, Sudarikova, 2021). Следующим этапом работы было изучение действия внеклеточных сериновых протеаз на активность ионных каналов в мембране эМСК. Известно, что протеолитическое расщепление внеклеточной петли альфа- и гамма-субъединиц канала, в том числе трипсином, вызывает активацию ENaC (например,

см.: Diakov et al., 2008; Kleyman, Eaton, 2020). В наших экспериментах cell-attached протеазу трипсин добавляли к наружной стороне мембранного фрагмента (в пипетку) в концентрации 5 мкг/мл. На рис. 3 представлен пример записей токов через трипсин-активируемые натриевые каналы при различных значениях мембранного потенциала, а также приведены соответствующие амплитудные гистограммы и вольтамперная характеристика; зарегистрирована типичная активность натриевых каналов с проводимостью около 12 пСм. Вероятность открытого состояния каналов P_o , рассчитанная для временных интервалов, представленных на рис. 3*а*, составила 0.20–0.24 и практически не зависела от потенциала в диапазоне –30... –60 мВ.

Таким образом, можно заключить, что в плазматической мембране эМСК функционируют натрий-проводящие каналы, которые, судя по своим биофизическим характеристикам и механизмам активации, принадлежат к семейству ENaC.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе исследования проводили на ранее охарактеризованных по маркерам, кариотипу и способности к направленной дифференцировке культивируемых мезенхимных стволовых клетках (МСК), выделенных из менструальной крови (Земелько и др., 2011; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019),

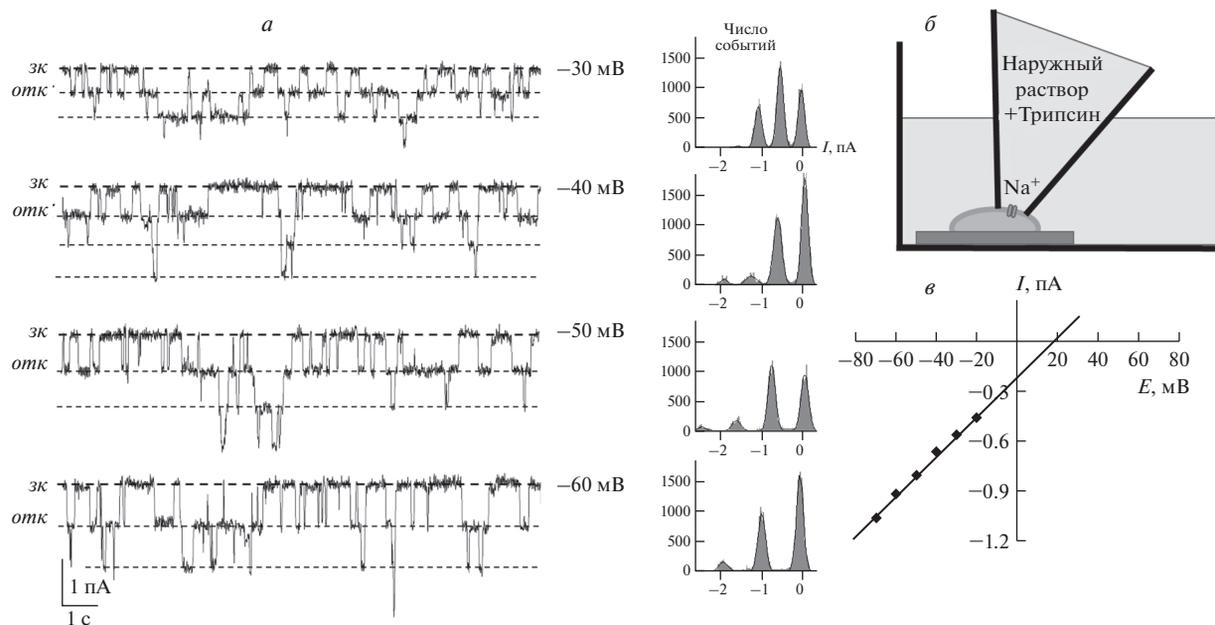


Рис. 3. Активность натриевых каналов ENaC, индуцированная действием протеазы трипсин. *a* – Записи токов при различных значениях поддерживаемого потенциала и соответствующие им амплитудные гистограммы, расстояния между пиками которых равны амплитуде одиночного открывания; *б* – схема эксперимента. Для активации натриевых каналов добавляли 5 мкг/мл трипсина в наружный раствор в пипетке. *в* – Вольтамперная характеристика натриевых каналов.

что выгодно отличает их от других МСК неинвазивным способом выделения.

Как уже отмечалось ранее, натриевые каналы ENaC, характерные для эпителия почек и легких, были обнаружены в клетках различной специализации (Сударикова и др., 2012; Sudarikova et al., 2015; Kleuman, Eaton, 2020). В настоящее время исследование экспрессии ENaC и их влияния на жизнедеятельность стволовых клеток различного происхождения находятся на начальном этапе. Так, в единичных работах последних лет есть данные об экспрессии одной (альфа-) или нескольких субъединиц ENaC (альфа-, бета-, гамма-, дельта) в стромальных стволовых клетках, выделенных из костного мозга человека (Nam et al., 2020), а также в нейрональных стволовых клетках мыши (Petrik et al., 2018). Обнаружено положительное влияние кондиционированной среды от МСК, выделенных из костного мозга, на уровень трансэпителиального амилорид-чувствительного тока и экспрессию альфа-субъединицы ENaC в эпителиальных клетках легкого человека (клетки линии H441) или в культуре первичных клеток AT2 мыши (Ding et al., 2020). Сокультивирование МСК из костного мозга и клеток H441 или AT2 также приводило к увеличению амилорид-чувствительного тока и уровня белка субъединиц альфа и гамма ENaC (Zhang et al., 2020).

В настоящей работе мы подтвердили наличие субъединицы альфа ENaC в эМСК с помощью иммуофлуоресцентной микроскопии. Кроме того, с

использованием метода патч-кламп впервые зарегистрировали активность потенциал-независимых натрий-проводящих каналов в плазматической мембране эМСК и определили их биофизические характеристики. Одиночные каналы анализировали в квазифизиологических условиях (145 mM NaCl) на участке мембраны нативной клетки (конфигурация cell-attached). Значения проводимости (11–13 пСм) и потенциала реверсии (около 20 мВ) натриевых каналов, обнаруженных в эМСК, были близки к значениям этих же показателей амилорид-нечувствительных каналов ENaC в трансформированных клетках крови (Сударикова и др., 2012, 2018; Sudarikova et al., 2019), а также каналов ENaC, изучаемых в основном в экспрессионных системах (ооцитах *Xenopus*) и содержащих в своем составе дельта-субъединицу (Ji et al., 2006). Хотелось бы отметить, что для каналов ENaC известна вариабельность данных по проводимости и селективности в зависимости от объекта, условий культивирования, а также их субъединичного состава (например: Kellenberger, Shield, 2002; Ji et al., 2006).

Чтобы подтвердить, что обнаруженные нами в эМСК натриевые каналы принадлежат к семейству ENaC, мы провели их функциональную идентификацию с использованием электрофизиологического подхода и известными активаторами ENaC. Мы обнаружили, что добавление деструктора актиновых филаментов ЦитД приводит к активации натриевых каналов со сходными биофизическими параметрами, что и у каналов в фоне. Данный механизм активации

характерен как для эндогенных каналов ENaC в собирательных трубочках почки, так и для каналов в трансфицированных клетках, например, НЕК 293 (Karpushev et al., 2010; Morachevskaya, Sudarikova, 2021). Кроме того, активация каналов ENaC при разборке актинового цитоскелета является основным механизмом их регуляции в клетках неэпителиального происхождения, в том числе клетках лейкемии и лимфомы человека (Negulyaev et al., 2000; Sudarikova et al., 2015; Morachevskaya, Sudarikova, 2021).

Сериновую протеазу трипсин часто используют как известный и относительно простой инструмент для идентификации каналов ENaC или повышения их активности до максимального уровня, что вызывается протеолитическим расщеплением альфа- или гамма-субъединиц в зоне экстраклеточных петель (Diakov et al., 2008; Kleuman, Eaton, 2020). В наших экспериментах при добавлении трипсина в пипетку мы регистрировали довольно высокий уровень активности каналов в мембране ЭМСК (по сравнению с фоновой активностью каналов), что также служит значимым дополнительным аргументом в пользу идентификации обнаруженных нами каналов как каналов ENaC.

Ранее в транспортных эпителиях и на модельных системах (ооцитах *Xenopus*) показано, что ENaC обладает механочувствительностью и их активность может регулироваться механическими стимулами, такими как проток жидкости (flow activation), который повышает вероятность нахождения каналов в открытом состоянии (Verschuren et al., 2020). Недавние исследования на нейрональных стволовых клетках выявили влияние активности ENaC на клеточную пролиферацию зависимым от протока жидкости образом (Petrik et al., 2018). Кроме того, было показано воздействие механической деформации на дифференцировку МСК, которое опосредовано каналами ENaC (Nam et al., 2020). В совокупности все имеющиеся результаты, а также тот факт, что характер активности и профиль экспрессии ионных каналов в клетках, взятых из различных тканей, могут значительно различаться, дают нам основания рассматривать ЭМСК как перспективный объект для дальнейшего изучения роли ENaC в клеточных ответах на изменение механических свойств микроокружения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.Г. Шерстнева за помощь на предварительном этапе электрофизиологических опытов с активаторами каналов. Флуоресцентные изображения получали с помощью конфокальных микроскопов в Центре коллективного пользования Института цитологии РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00106).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не проводили экспериментов на животных или людях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильева В.Ю., Чубинский-Надеждин В.И.* 2021. Локальный механозависимый вход кальция контролирует активность кальций-зависимых калиевых каналов высокой и низкой проводимости в клетках лимфомы человека. Цитология. Т. 63. С. 1. (*Vasileva V.Y., Chubinskiy-Nadezhdin V.I.* 2021. Local mechano-dependent calcium influx controls the activity of calcium-dependent potassium channels of big and small conductance in human lymphoma cells. Tsitologiya. V. 63. P. 1.)
- Ведерникова Е.А., Максимов А.В., Негуляев Ю.А.* 1999. Функциональная характеристика и молекулярная топология потенциал-независимых натриевых каналов. Цитология. Т. 41. С. 658. (*Vedernikova E.A., Maksimov A.V., Negulyaev Yu.A.* 1999. Functional characteristic and molecular topology of voltage independent sodium channels. Tsitologiya. V. 41. P. 658.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н.* 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия: выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. С. 919. (*Zemel'ko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artsybasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolskii N.N.* 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. Cell Tissue Biol. V. 6. P. 1.)
- Сударикова А.В., Васильева И.О., Морачевская Е.А., Негуляев Ю.А.* 2012. Молекулярная и функциональная идентификация натриевых каналов в клетках K562. Цитология. Т. 54. С. 573. (*Sudarikova A.V., Vassilieva I.O., Morachevskaya E.A., Negulyaev Yu.A.* 2012. Molecular and functional identification of sodium channels in K562 cells. Cell Tissue Biol. V. 6. P. 435.)
- Сударикова А.В., Чубинский-Надеждин В.И., Васильева В.Ю., Васильева И.О., Морачевская Е.А., Негуляев Ю.А.* 2018. Новый механизм активации актинуправляемых натриевых каналов в клетках K562. Цитология. Т. 60. С. 821. (*Sudarikova A.V., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Vassilieva I.O., Morachevskaya E.A., Negulyaev Yu.A.* 2018. Novel activatory mechanism of actin-gated sodium channels in K562 cells. Tsitologiya. V. 60. P. 821.)
- Сударикова А.В., Шилина М.А., Чубинский-Надеждин В.И., Гринчук Т.М., Морачевская Е.А., Негуляев Ю.А.* 2019. Повышенная миграционная способность эндометриальных мезенхимных стволовых клеток при адено-

- миозе. Цитология. Т. 61. С. 964. (*Sudarikova A.V., Shilina M.A., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Grinchuk T.M., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A.* 2020. Increased migration ability of adenomyosis-derived endometrial mesenchymal stem cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 14. P. 190.)
- Чубинский-Надеждин В.И., Сударикова А.В., Никольский Н.Н., Морачевская Е.А.* 2013. Роль примембранного актинового цитоскелета в регуляции потенциалнезависимых натриевых каналов. Доклады Академии Наук. Т. 450. С. 112. (*Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Sudarikova A.V., Nikolsky N.N., Morachevskaya E.A.* 2013. Role of submembranous actin cytoskeleton in regulation of non-voltage-gated sodium channels. *Dokl. Biochem. Biophys.* V. 450. P. 126.)
- Чубинский-Надеждин В.И., Шилина М.А., Сударикова А.В., Люблинская О.Г., Негуляев Ю.А., Морачевская Е.А.* 2020. Зависимость присутствия кластеризованного ганглиозида GM1 в мембране эндометриальных мезенхимных стволовых клеток от фазы клеточного цикла. Цитология. Т. 62. С. 753. (*Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Shilina M.A., Sudarikova A.V., Lyublinskaya O.G., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A.* 2020. Presence of Clustered GM1 Ganglioside in the Membrane of Endometrial Mesenchymal Stem Cells is Dependent on Cell Cycle Stage. *Cell Tiss. Biol.* V. 15. P. 120.)
- Banu S.K., Lee J., Starzinski-Powitz A., Arosh J.A.* 2008. Gene expression profiles and functional characterization of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells. *Fertil. Steril.* V. 90. P. 972.
- Chen L., Qu J., Xiang C.* 2019. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* V. 10. P. 1.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Sudarikova A.V., Shilina M.A., Vasileva V.Y., Grinchuk T.M., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Negulyaev Y.A.* 2019. Cell cycle-dependent expression of BK channels in human mesenchymal endometrial stem cells. *Sci. Rep.* V. 9. P. 4595.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Pugovkina N.A., Vassilieva I.O., Morachevskaya E.A., Nikolsky N.N., Negulyaev Y.A.* 2017. Local calcium signalling is mediated by mechanosensitive ion channels in mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 482. P. 563.
- Diakov A., Bera K., Mokrushina M., Krueger B., Korbmacher C.* 2008. Cleavage in the gamma-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the proteolytic activation of near-silent channels. *J. Physiol.* V. 586. P. 4587.
- Ding Y., Cui Y., Hou Y., Nie H.* 2020. Bone marrow mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates fluid resolution via miR-214-activating epithelial sodium channels. *MedComm.* V. 1. P. 376.
- Ji H.L., Su X.F., Kedar S., Li J., Barbry P., Smith P.R., Matalon S., Benos D.J.* 2006. δ -Subunit confers novel biophysical features to $\alpha\beta\gamma$ -human epithelial sodium channel (ENaC) via a physical interaction. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 8233.
- Karpushev A.V., Ilatovskaya D.V., Pavlov T.S., Negulyaev Y.A., Staruschenko A.* 2010. Intact cytoskeleton is required for small G protein dependent activation of the epithelial Na channel. *PLoS One.* V. 5. P. e8827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008827>
- Kellenberger S., Schild L.* 2002. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* V. 82. P. 735.
- Kleyman T.R., Eaton D.C.* 2020. Regulating ENaC's gate. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* V. 318. P. C150.
- Mirshahi M., Mirshahi S., Golestaneh N., Nicolas C., Mishal Z., Agarwal M.K.* 1998. Mineralocorticoid hormone receptor and the epithelial sodium channel in a human leukemic cell line. *Endocrine Res.* V. 24. P. 455.
- Morachevskaya E.A., Sudarikova A.V.* 2021. Actin dynamics as critical ion channel regulator: ENaC and Piezo in focus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* V. 320. P. C696.
- Nam H.Y., Murali M.R., Ahmad R.E., Pinguan-Murphy B., Raghavendran H.R.B., Kamarul T.* 2020. Mechanical strain-mediated tenogenic differentiation of mesenchymal stromal cells is regulated through epithelial sodium channels. *Stem Cells Int.* V. 18. P. 5385960. <https://doi.org/10.1155/2020/5385960>
- Negulyaev Y.A., Khaitlina S.Y., Hinssen H., Shumilina E.V., Vedernikova E.A.* 2000. Sodium channel activity in leukemia cells is directly controlled by actin polymerization. *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 40933.
- Petrik D., Myoga M.H., Grade S., Gerkau N.J., Pusch M., Rose C.R., Grothe B., Götz M.* 2018. Epithelial sodium channel regulates adult neural stem cell proliferation in a flow-dependent manner. *Cell Stem Cell.* V. 22. P. 865.
- Shumilina E.V., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A., Hinssen H., Khaitlina S.Y.* 2003. Regulation of sodium channel activity by capping of actin filaments. *Mol. Biol. Cell.* V. 14. P. 1709.
- Sudarikova A.V., Tsaplina O.A., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A.* 2015. Amiloride-insensitive sodium channels are directly regulated by actin cytoskeleton dynamics in human lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 461. P. 54.
- Sudarikova A.V., Vasileva V.Y., Vassilieva I.O., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A., Chubinskiy-Nadezhdin V.I.* 2019. Extracellular protease trypsin activates amiloride-insensitive sodium channels in human leukemia cells. *J. Cell. Biochem.* V. 120. P. 461.
- Verschuren E., Castenmiller C., Peters D., Arjona F.J., Bindels R., Hoenderop J.* 2020. Sensing of tubular flow and renal electrolyte transport. *Nat. Rev. Nephrol.* V. 16. P. 337.
- Zhang H., Ding Y., Hou Y., Liu Y., Zhou Z., Nie H.* 2020. Bone marrow mesenchymal stem cells derived miRNA-130b enhances epithelial sodium channel by targeting PTEN. *Respir. Res.* V. 21. P. 329.

Functional Activity of Sodium Channels ENaC in Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells

A. V. Sudarikova^{a, *}, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin^a, V. Y. Vasileva^a, D. V. Lysikova^{a, b}, M. A. Shorokhova^a,
E. A. Morachevskaya^a, and Yu. A. Negulyaev^a

^a Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

^b St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great, St. Petersburg, 195251 Russia

*e-mail: anastasia.sudarikova@gmail.com

The work is aimed to reveal the functional activity of sodium channels ENaC in human endometrial mesenchymal stem cells (eMSC). Immunofluorescent staining of the cells showed the presence of the main pore-forming alpha-subunit of ENaC in eMSC. For the electrophysiological study of sodium channels and the analysis of the effects of potential ENaC activators, we used the possibility of unitary currents recording in plasma membrane patch on native cell (cell-attached variant). In experiments on eMSC, background activity of sodium channels was found, their activation was shown in response to cytochalasin D-induced actin cytoskeleton disassembly; the biophysical properties of single channels were estimated. Typical channel activity was also observed when serine protease trypsin, a known stimulator of ENaC channels, was added to the outside of the membrane patch. The current-voltage characteristics of sodium channels activated by the action of cytoskeleton destructor or extracellular protease were similar: unitary conductance was 11–13 pS. Thus, the physiological pathways of ENaC channel stimulation in human endometrial stem cells were identified. Revealed intracellular and extracellular mechanisms of ENaC channel regulation can provide rapid changes in the sodium permeability of the plasma membrane of stem cells.

Keywords: human mesenchymal stem cells, patch clamp, plasma membrane, sodium channels ENaC, actin cytoskeleton

СТАБИЛЬНОСТЬ КАРИОТИПА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2021 г. М. А. Шорохова¹, *, Т. М. Гринчук¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: shili-mariya@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.06.2021 г.

После доработки 18.06.2021 г.

Принята к публикации 01.07.2021 г.

Применение мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) предполагает генетическую стабильность трансплантируемого клеточного материала и наличие его в значительном количестве. Нарастание биомассы клеток возможно только в условиях *in vitro*, что сопряжено с возможными рисками нарушения их генетической стабильности. В настоящей работе проанализирована кариотипическая стабильность 3-х клеточных линий МСК эндометрия (эМСК) после введения клеток в культуру и в процессе последующего культивирования. Установлено, что при переводе в систему *in vitro* клетки претерпевали кариотипические изменения. Профиль изменчивости проанализированных эМСК носил индивидуальный характер. Установлено, что клетки линии без грубых нарушений в структуре хромосом претерпели реверсию к кариотипической норме. Клетки с нарушениями генетического материала, вызванными хромосомными поломками и анеуплоидией в процессе культивирования имели тенденцию к последующей дестабилизации. Полученные данные вносят существенный вклад в изучение стабильности генетического аппарата эМСК.

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стволовые клетки, хромосомы, эктопическая конъюгация, нарушенная конденсация, хромосомные поломки, анеуплоидия, дестабилизация

DOI: 10.31857/S0041377121050102

Активный поиск доступных и удобных в работе источников стволовых клеток человека с большими потенциальными для регенеративной медицины привел к обнаружению мезенхимных стволовых клеток (МСК) в десквамированном эндометрии менструальной крови человека (Meng et al., 2007; Земелько и др., 2011). В настоящее время МСК эндометрия (эМСК) рассматриваются как перспективный клеточный материал для использования в медицинских целях. Основанием этого послужили доступность донорского материала, возможность неинвазивного способа выделения клеток и их высокий пролиферативный потенциал в культуре (Zuo et al., 2018). Установлено, что эМСК способны секретировать большое количество VEGF, HGF и JGF1 – факторов, играющих ключевую роль в восстановлении и регенерации тканей (Domnina et al., 2020). Применение МСК в терапевтических целях предполагает генетическую стабильность трансплантируемого клеточного материала и наличие его в значительном количестве. Нарастание биомассы МСК возможно только в усло-

виях *in vitro*, что сопряжено с возможными рисками нарушения их генетической стабильности.

Важным тестом, способным оценить стабильность генома как на уровне клетки, так и на уровне популяции является кариотипический анализ. Применение метода дифференциальной окраски хромосом на G-диски (G-banding) позволяет оценить стабильность генома на основании данных о числе хромосом и их морфологии. Стандартный кариотипический набор характеризуется постоянством числа хромосом и их структуры. Любые отклонения рассматриваются как нежелательные и характеризуют клетку как генетически дефектную (Heng et al., 2013). Данный анализ приобретает особую значимость в связи с представлением о том, что нарушение генетической стабильности клеток может стать причиной развития онкогенной клеточной трансформации (Ross et al., 2011). Вопрос о стабильности эМСК в связи с переводом клеток в условия культуры остается открытым. Данные, полученные к настоящему моменту разными авторами на МСК различного происхождения, противоречивы. Согласно одним работам, при переводе в условия *in vitro* МСК остаются кариотипически стабильны (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008), согласно другим – приобретают кариотипиче-

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки; эМСК – эндометриальные МСК.

ские изменения (Borgonovo et al., 2014). В связи с тем, что эмСК рассматриваются как перспективный материал для использования в регенеративной медицине, оценка кариотипической стабильности этих клеток в культуре является актуальным вопросом.

Задача настоящей работы заключалась в том, чтобы проанализировать кариотипическую стабильность 3-х клеточных линий эмСК после введения клеток в культуру и в процессе последующего культивирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и их культивирование. Исследовали 3 линии эмСК человека (рабочие названия линий: 1, 2, 3), полученные и охарактеризованные в ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки анализируемых линий имели поверхностные маркеры мезенхимного ряда (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) и не несли гемопоэтические маркеры (CD11b, CD34, CD45, CD117, CD130, HLA-DR класса 2). Клетки всех 3-х линий были способны к направленной к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях (Земелько и др. 2011).

Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% антибиотика-антимикотика и 1% GlutaMAX (Gibco, США). Клетки пересевали 2 раза в неделю в соотношении 1 : 3–1 : 4, используя 0.05%-ный раствор трипсин–ЭДТА (Invitrogen, США).

Кариотипический анализ. Использовали метод дифференциальной окраски хромосом на G-диски. Для приготовления препаратов клетки высеивали с плотностью $(14–15) \times 10^3$ кл./см². Через 24–25 ч в культуру добавляли 0.02 мг/мл колцемида (Sigma, США) на 1 ч. Затем среду удаляли, клетки открепляли от пластика 0.05%-ным раствором трипсина, клеточную суспензию центрифугировали (1500 об./мин), супернатант удаляли, осадок ресуспензировали и подвергали гипотонической обработке 0.56%-ным раствором KCl (1 ч). Затем суспензию центрифугировали (1300 об./мин), супернатант удаляли, клеточную суспензию фиксировали в течение 1.5 ч холодной смесью метанола с уксусной кислотой (3 : 1), трижды заменяя за это время фиксатор на свежий. Фиксированный материал раскапывали на холодные и влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед. высушивали при комнатной температуре. Метафазные пластинки окрашивали красителем Гимза на фосфатном буфере после предварительной трипсинизации (Биолот, Россия). Цитогенетический анализ проводили с использованием светового микроскопа Axio Scop (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 20× и 100×. Хромосомы идентифициро-

вали в соответствии с международной номенклатурой (Mitelman, 1995) и атласом хромосом человека (Мамаева, 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитогенетический анализ препаратов метафазных хромосом эмСК показал, что клетки всех 3-х линий уже с ранних пассажей проявляли признаки кариотипической гетерогенности. Профиль кариотипической нестабильности для каждой линии был индивидуален.

Линия 1. В популяции линии 1 на 3-ем пассаже культивирования были обнаружены два варианта клеток: около 50% клеток в популяции имели стандартный набор хромосом, другая часть популяции характеризовалась кариотипическими дефектами. Дефекты были связаны с появлением изохромосом (возникших в результате неполного расхождения в митозе гомологичных копий) и хромосом с нарушенной конденсацией в одной из копий, а также с межхромосомными ассоциациями (эктопической конъюгацией) и возникновением моно- или трисомии по отдельным хромосомам (рис. 1). Выявленные изменения носили случайный характер. Исключение составляли межхромосомные ассоциации с неоднократным вовлечением в них хромосом 13, 14, 15, при этом вторым партнером сцепления могла быть любая хромосома набора. В результате повторного анализа клеток этой линии на 6-ом пассаже были выявлены такие же изменения, как и на 3-ем, однако появился новый тип хромосомных отклонений — хромосомные поломки (рис. 1). Хромосомные поломки затрагивали область центромеры, при этом наблюдались полное или частичное сохранение генетического материала. Частота встречаемости клеток с кариотипическими отклонениями была несколько больше по сравнению с более ранним пассажем. Каждое выявленное изменение само по себе было уникальным, что говорит о случайном характере выявляемых кариотипических отклонений. Кариотипический анализ на 15-ом пассаже выявил, что анализируемая клеточная культура стабилизировалась. Преимущество имели клетки с нормальным кариотипом (рис. 1). Нарушение конденсации в гомологах отсутствовало. Двуплечая изохромосома (15/15) равно как и эктопическая конъюгация (13/14) встретились единожды. В 4-х клетках из 16 наблюдали моносомию случайного характера. Хромосомные поломки отсутствовали.

Линия 2. Клетки линии 2 на 3-ем пассаже так же, как и клетки линии 1 характеризовались наличием 2-х субпопуляций: с нормальным кариотипом и с кариотипическими отклонениями. Однако число клеток с нормальным кариотипом составляло только

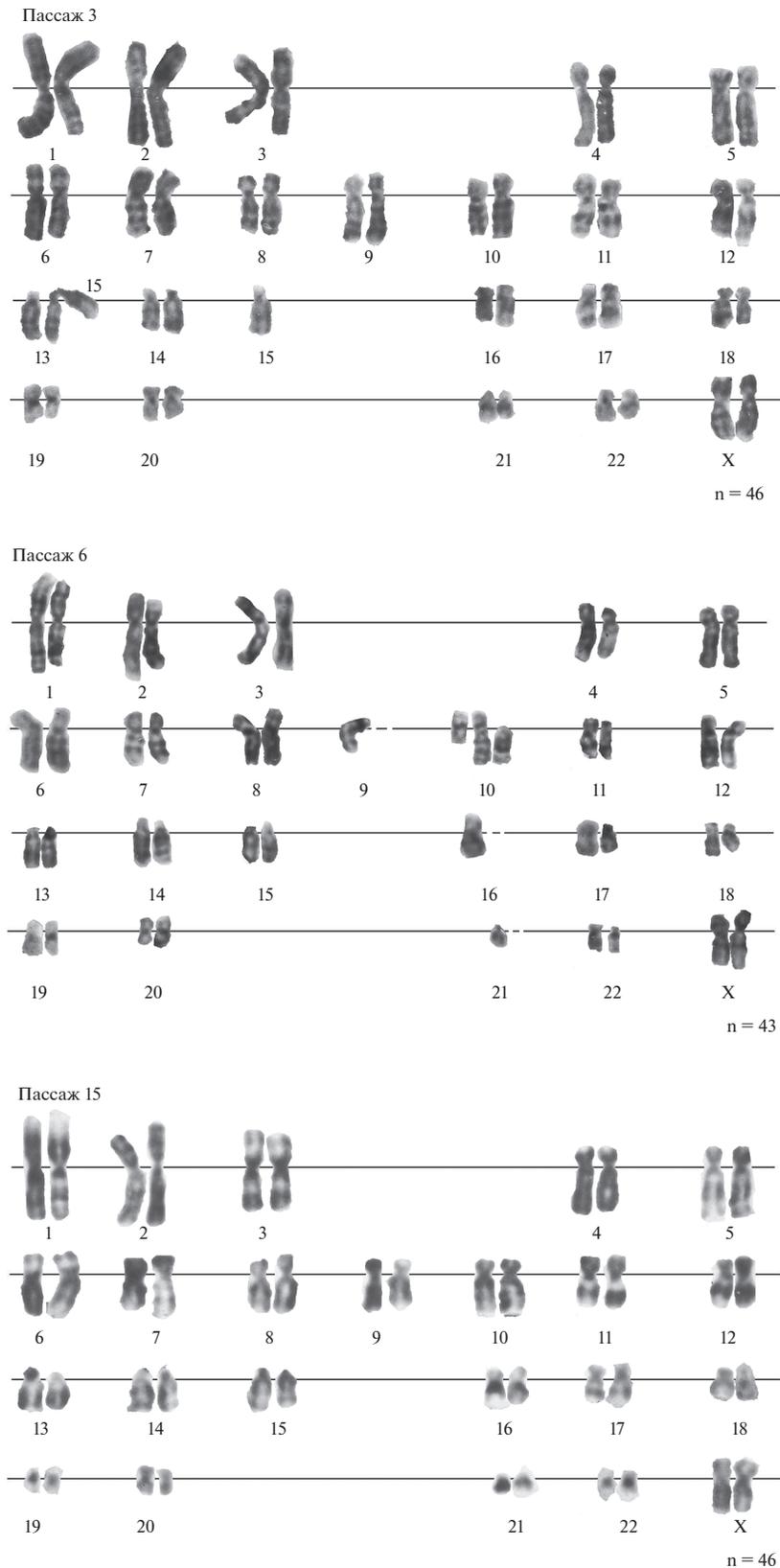
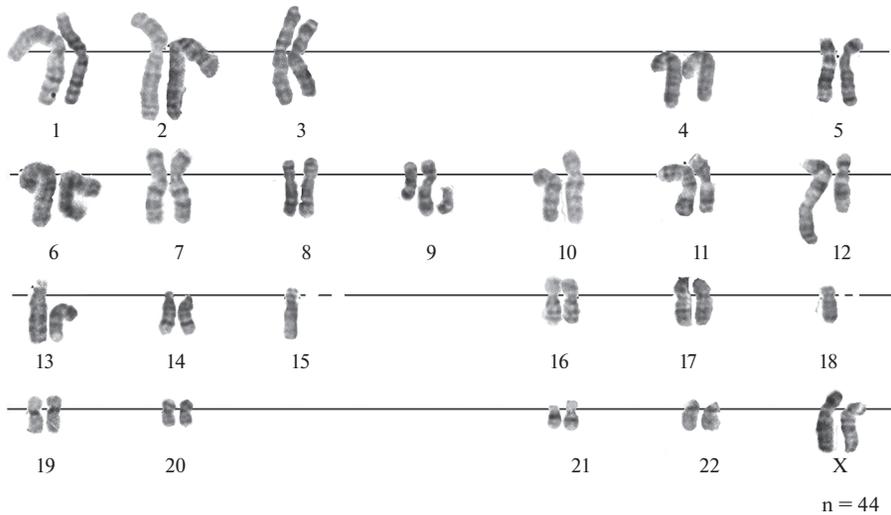


Рис. 1. Кариотипы клеток линии 1 на разных этапах культивирования. Пассаж 3: эктопическая конъюгация хромосом 13 и 15. Пассаж 6: моносомия по хромосомам 9, 16 и 21; прицентромерная поломка хромосомы 10 с сохранением материала. Пассаж 15: нормальный кариотип. На рис. 1–3: n – число хромосом в кариотипе.

Пассаж 3



Пассаж 14

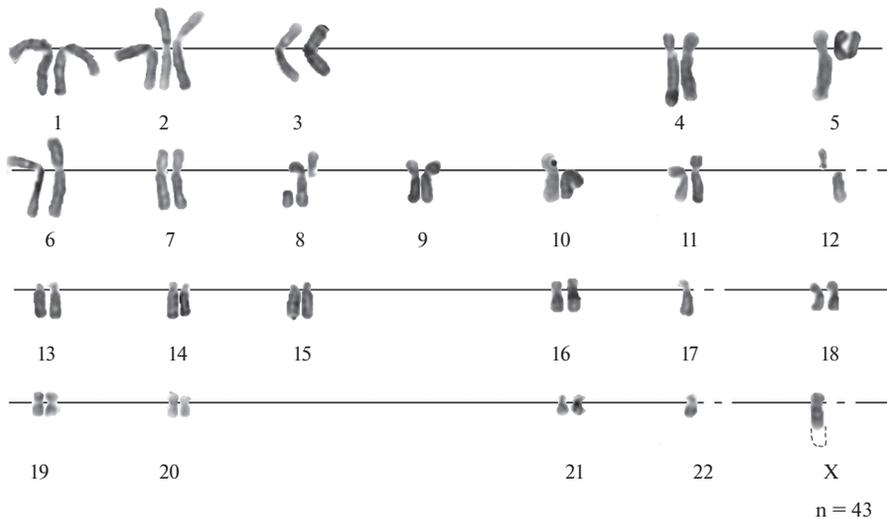


Рис. 2. Кариотипы клеток линии 2 на разных этапах культивирования. Пассаж 3: поломка хромосомы 9 с сохранением материала; эктопическая конъюгация хромосом 12 и 15. Пассаж 14: трисомия по хромосоме 2, моносомия хромосом 12, 17, 22 и X; прицентромерная поломка с сохранением материала хромосом 8 и 12; делеция в хромосоме X.

25%. Характер выявленных изменений существенно отличался от изменений в клетках линии 1. Основными изменениями, выявленными в клетках линии 2, были хромосомные поломки и моносомия (рис. 2). В клетках проанализированной популяции наблюдали преимущественно вовлечения определенных хромосом в изменения. Так, в 3-х метафазных пластинках наблюдали прицентромерные поломки в хромосоме 1. И по этой же хромосоме неоднократно наблюдали трисомию. Изменения в других хромосомах (поломки с сохранением генетического материала, частичной его утратой или транслоцированием безцентромерного локуса на другую хромосому) носили слу-

чайный характер. В отдельных клетках выявляли эктопическую конъюгацию между нехомологичными хромосомами с участием в качестве одного из партнеров хромосом 12 и 15 (рис. 2).

Повторный кариотипический анализ клеток линии 2 на 14-ом пассаже выявил значительное увеличение степени кариотипической дестабилизации популяции. Характер выявляемых кариотипических дефектов остался таким же, как и на раннем этапе культивирования, однако количество хромосом, равно, как и количество клеток, вовлекаемых в отклонения, значительно увеличилось. В процесс дестабилизации были включены все хромосомы набора за ис-

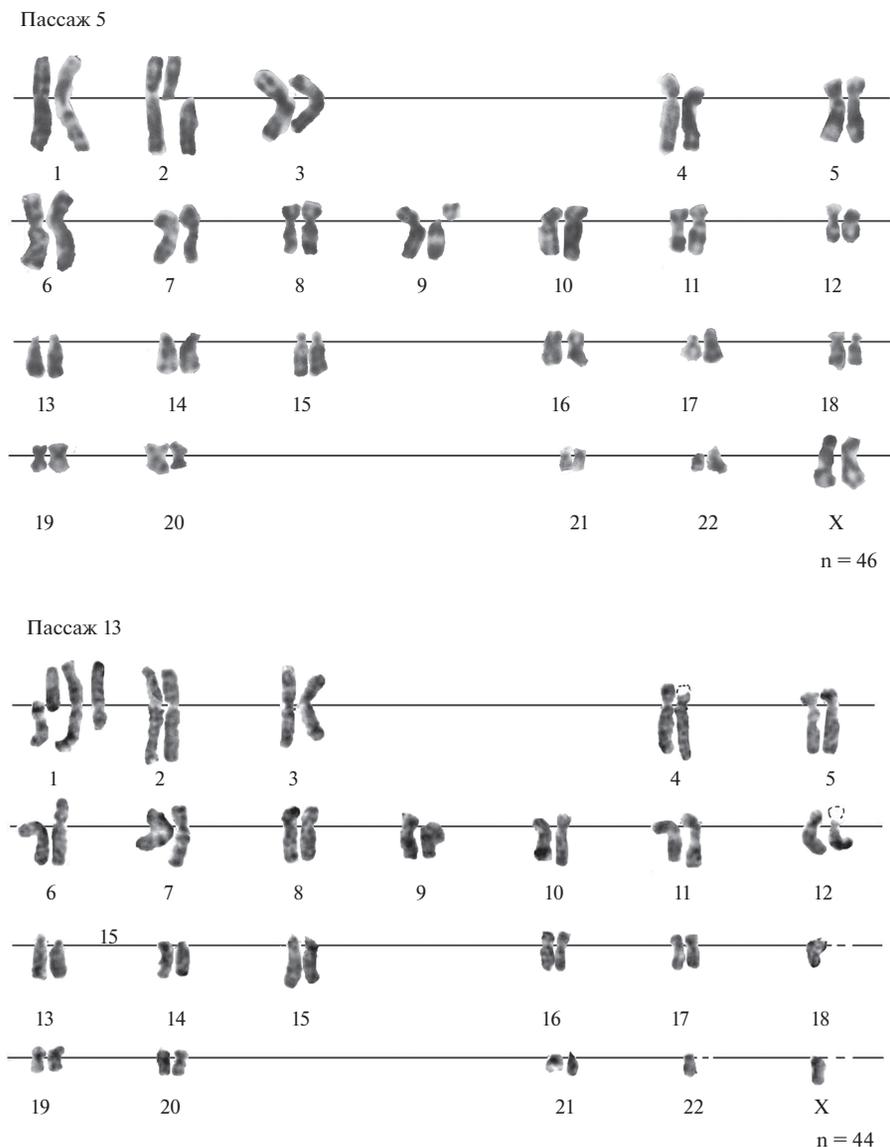


Рис. 3. Кариотипы клеток линии 3 на разных этапах культивирования. Пассаж 5: прицентромерная поломка с сохранением материала в хромосомах 2 и 9. Пассаж 13: трисомия и поломка двух гомологов хромосомы 1 с сохранением материала и делетированием соответственно; делеция в *p*-плече хромосом 4 и X; делеция *p*-плеча хромосомы 12; моносомия по хромосоме 18, 22, X.

ключением хромосомы 16. Клетка могла быть маркирована не одним, а несколькими разнотипными изменениями (рис. 2). Хромосомные поломки в большинстве случаев сопровождалась делетированием части хромосомного материала. Такие изменения как наличие изохромосом и межхромосомных ассоциаций были единичными. В некоторых клетках наблюдали отсутствие сразу двух гомологов.

Линия 3. По степени гетерогенности на начальном этапе культивирования (пассаж 5) клетки этой линии были схожи с клетками линии 2, и большая часть популяции имела кариотипические дефекты. Выявляемые отклонения были представлены хромо-

сомными поломками, как с сохранением, так и утратой генетического материала, и анеуплоидией наличием трисомий и моносомий по отдельным хромосомам (рис. 3). Повышенной нестабильностью характеризовались хромосомы 2 и 4. Вовлечение в кариотипические изменения остальных хромосом набора носило случайный характер. Анализ клеток линии 3 на 13-ом пассаже показал, что характер изменений и доля популяции с кариотипическими дефектами остались такими же, как на 6-ом пассаже. Однако на 13-ом пассаже наблюдали увеличение количества хромосом, вовлекаемых в перестройки, в некоторых клетках в перестройки были вовлечены обе гомоло-

гичные хромосомы. Хромосомные поломки в хромосомах 6, 12, 16 и X были выявлены неоднократно (рис. 3). Число хромосом, вовлеченных в анеуплоидию при этом существенно не изменилось (на 6-ом пассаже число хромосом, вовлеченных в анеуплоидию было 11, на 13-ом пассаже – 12 из кариотипического набора). Эктопическая конъюгация была найдена только в одной клетке.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из того, что эмМК рассматриваются как перспективные источники биоматериала для использования в регенеративной и восстановительной терапии, важно знать, насколько они генетически стабильны в условиях культуры. Существуют данные, что в связи с переводом в искусственные условия жизнедеятельности клетки претерпевают разного типа стрессы, связанные со способом посева, с реактивами, используемыми при культивировании, с плотностью культуры (Jacobs et al., 2016), а также с температурным режимом (Tan et al., 2019), влажностью, насыщением клеток кислородом (Ueyama et al., 2012), продолжительностью культивирования и человеческим фактором (Rajamani et al., 2014). Есть данные, что при культивировании стволовых клеток энзиматический способ посева клеток способствует дестабилизации клеточного генома (Ruby, Zheng, 2009).

В основе генетических изменений в клетках, связанных с воздействием стрессовых факторов, лежат разные механизмы: сбой в программе клеточного деления, возникновение двухцепочечных разрывы ДНК и изменения метилирования ДНК. Возникающие изменения инициируют неправильную сегрегацию тех или иных хромосом кариотипического набора, возникновение ане-, полиплоидии, которая сама по себе может стать индуктором последующей нестабильности, разнотипных несбалансированных хромосомных перестроек и конформационных изменений в хромосомах. Важно отметить, что возникающие отклонения на уровне кариотипа могут носить как случайный, так и неслучайный характер. В настоящем исследовании повышенной склонностью к агрегации характеризовались хромосомы 13, 14 и 15. Интересно, что связь этих хромосом с неслучайной эктопической конъюгацией была описана и ранее на различных типах МК человека и мыши (Гринчук и др., 2008; Кольцова и др., 2018; Мусорина и др., 2019). Природа этого явления до конца не ясна. Тем не менее, существует предположение, что агрегация хромосом, равно как и изменения конденсации хроматина связаны с нарушениями метилирования ДНК (Heng et al., 2013).

В настоящей работе мы показали, что анализируемые в настоящей работе эмМК при переводе в условия *in vitro* претерпели генетические изменения. Однако профиль кариотипической изменчивости и динамика его развития оказались разными.

Наибольший интерес в связи с относительной кариотипической стабильностью вызывают клетки линии 1. Структурные изменения хромосом на раннем 3-ем пассаже определялись только такими генетическими изменениями, как эктопическая конъюгация негомолотических хромосом, неспецифические нарушения конденсации некоторых хромосом набора, сбой в программе клеточного деления, связанные с появлением в кариотипе изохромосом. Усиление кариотипической изменчивости на 6-ом пассаже, связанное с наличием единичных поломок хромосомного материала, нивелировалось при последующем культивировании и не оказывало влияния на изменение генетического статуса клеток. К 15-му пассажу большинство возникших ранее кариотипических изменений исчезали, и линия могла рассматриваться как кариотипически стабильная. Возможность подобной генетической реверсии к норме была описана Сталтзом с соавторами (Stultz et al., 2016) при анализе клеточных линий МК. Эти авторы установили, что на ранних этапах культивирования (3, 5-й пассажи) клетки характеризовались нестабильным кариотипом, однако к 7-ому пассажу 3 клеточные линии из 6 вернулись к нормальному кариотипу.

Две другие наши линии эмМК (линия 2 и 3), полученные, как и линия 1, в пределах одной лаборатории при использовании одинаковых питательных сред и прочих условий работы с клетками *in vitro*, уже на ранних этапах культивирования проявляли генетическую нестабильность, связанную с поломками хромосом и значительной степенью анеуплоидизации популяции. Каждая линия в процессе культивирования характеризовались индивидуальным профилем кариотипической изменчивости. В отличие от линии 1 выявленные изменения были связаны с поломками хромосомного материала и анеуплоидией. Зарегистрированная на первых этапах нестабильность прогрессировала во времени, в процесс дестабилизации вовлекались дополнительные хромосомы.

Сравнение полученных в настоящей работе данных с литературными данными по кариотипированию других типов МК показало, что если изменения в структуре кариотипа эмМК ограничивались преимущественно поломками хромосомного материала, а также моно- и трисомиями, в МК иного происхождения спектр возникающих aberrаций был значительно шире и включал транслокации, дубликации, кольцевые хромосомы, дицентрики, теломерные

ассоциации (Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009; Муссорина и др., 2019; Кольцова и др., 2020; Pesserini et al., 2016). Такой широкий спектр хромосомных изменений характерен для раковых опухолей. В этой связи наличие подобных перестроек в популяциях стволовых клеток настораживает, т. к. может рассматриваться как предпосылка к их трансформации, в частности, злокачественной (Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009; Pesserini et al., 2016).

В наших более ранних работах, проведенных на клеточных линиях эмСК методами молекулярного кариотипирования и секвенирования следующего поколения мы установили, что клетки с такими кариотипическими отклонениями как хромосомные поломки и анеуплоидия не имели онкогенного трансформационного потенциала (Vinogradov et al., 2017; Shilina et al., 2018). Обсуждая генетические дефекты, выявленные нами в прокариотипированных эмСК, можно говорить о том, что скорее всего они носят адаптивный характер, хотя донороспецифическое влияние на структурную нестабильность для линий 2 и 3 не исключается. Согласно полученным нами данным эмСК при переводе из системы *in vivo* в систему *in vitro* могут иметь индивидуальную историю адаптивных генетических изменений в связи с чем разный генетический статус.

Полученные в настоящей работе данные говорят в пользу того, что эмСК от линии к линии могут различаться как по начальному уровню кариотипической гетерогенности, так и по ее развитию в процессе пассирования. Наиболее благоприятным для нормализации культуры является наличие на ранних пассажах клеток с редкими неклональными дефектами, не затрагивающими структуру хромосом. Возникновение структурно перестроенных хромосом и выраженной анеуплоидии, как правило, имеет негативные последствия и ведет к последующей прогрессирующей во времени дестабилизации генома, что нежелательно, т. к. может спровоцировать онкогенную трансформацию. Поскольку клетки, не имеющие грубых изменений в структуре хромосом с единичными случайными изменениями, имеют шанс к нивелированию возникших на первых этапах культивирования изменений и возврату к генетической норме, при получении новых клеточных линий стволовых клеток важен их кариотипический анализ на ранних этапах культивирования. Не менее важна цитогенетическая оценка стволовых клеток при непосредственном использовании их в терапевтических целях.

Настоящее исследование представляет собой оригинальные приоритетные данные о генетической стабильности эмСК в культуре.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00108).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не проводили экспериментов на животных или людях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гринчук Т.М., Иванцов К.М., Алексеенко Л.Л., Кожухарова И.В., Зайчик А.М., Петров Н.С., Михайлов В.М., Попов Б.В. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих GFP. Цитология. Т.50. С. 1029. (Grinchuk T.M., Ivantsov K.M., Alekseenko L.L., Kozhukharova I.V., Zaichik A.M., Petrov N.S., Mikhailov V.M., Popov B.V. 2008. Characterization of the culture of mouse mesenchymal stem cells expressing GFP. Tsitologiya. V. 50. P. 1029.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artsybasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Beachevaya N.K., Korsak V.S., Nikolskiy N.N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium. Identification, characterization and use as a feeder layer for the cultivation of human embryonic stem lines. Tsitologiya. V. 53. P. 919.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток выделенных из пульпы молочного зуба человека. Цитология. Т.60. С. 955. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2018. Obtaining and characterization of a line of mesenchymal stem cells isolated from the pulp of a human milk tooth. Tsitologiya. V. 60. P. 955.) <https://doi.org/10.1134/S0041377118120015>
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62. С. 713. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2020. Obtaining and characterization of mesenchymal stem cell lines isolated from different areas of the placenta of the same donor. Tsitologiya. V. 62. P. 713) <https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>
- Мамаева С.Е. 2002. Атлас хромосом — постоянные клеточные линии человека и животных. М.: Науч. мир. 231 с. (Mamaeva S.E. 2002. Atlas chromosomes permanent cell lines of human and animals. M.: Nauchny mir. 231 p.)

- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммортилизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. С. 272. (Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2019. Characteristics of a non-immortalized line of mesenchymal stem cells isolated from human epicardial adipose tissue. Tsitologiya. V. 61. P. 272) <https://doi.org/10.1134/S0041377119040047>
- Попов Б.В., Петров Н.С. Михайлов В.М., Томилин А.Н., Алексеенко Л.Л., Гринчук Т.М., Зайчик А.М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре *in vitro*. Цитология. Т. 51. С. 91. (Popov B.V., Petrov N.S. Mikhailov V.M., Tomilin A.N., Alekseenko L.L., Grinchuk T.M., Zaichik A.M. 2009. Spontaneous transformation and immortalization of mesenchymal stem cells in *in vitro* culture. Tsitologiya. V. 51. P. 91.)
- Borgonovo T., Vaz I.M., Senegaglia A.C., Rebelatto C.L., Brofman P.R. 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. V. 36. P. 202. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.006>
- Domnina A., Ivanova J., Alekseenko L., Kozhukharova I., Borodkina A., Pugovkina N., Smirnova I., Lyublinskaya O., Fridlyanskaya I., Nikolsky N. 2020. Three-dimensional compaction switches stress response programs and enhances therapeutic efficacy of endometrial mesenchymal stem/stromal cells. Front. Cell Dev. Biol. V. 8. P. 473. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00473>
- Heng H.H., Liu G., Stevens J.B., Abdallah B.Y., Horne S.D., Ye K.J., Bremer S.W., Chowdhury S.K., Ye C.J. 2013. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. Cytogenet. Genome Res. V. 139. P. 144. <https://doi.org/10.1159/000348682>
- Jacobs K., Zambelli F., Mertzaniadou A., Smolders I., Geens M., Nguyen H.T., Barbé L., Sermon K., Spits C. 2016. Higher-density culture in human embryonic stem cells results in DNA damage and genome instability. Stem Cell Reports. V. 6. P. 330. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.015>
- Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Rioridan N.H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J. Transl. Med. V. 5. P. 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>
- Mitelman F. (Ed.) 1995. ISCN: Intrnation system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 114 p.
- Passerini V., Ozeri-Galai E., de Pagter M.S., Donnelly N., Schmalbrock S., Kloosterman W.P., Kerem B., Storchová Z. 2016. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. Nat. Commun. V. 7. P. 10754. <https://doi.org/10.1038/ncomms10754>
- Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. Cell Transplant. V. 17. P. 303. <https://doi.org/10.1038/ncomms10754>
- Rajamani K., Li Y.S., Hsieh D.K., Lin S.Z., Harn H.J., Chiou T.W. 2014. Genetic and epigenetic instability of stem cells. Cell Transplant. V. 23. P. 417. <https://doi.org/10.3727/096368914X678472>
- Ross A.L., Leder D.E., Weiss J., Izakovic J., Grichnik J.M. 2011. Genomic instability in cultured stem cells: Associated risks and underlying mechanisms. Regen. Med. V. 5. P. 653. <https://doi.org/10.3727/096368914X678472>
- Ruby K.M., Zheng B. 2009. Gene targeting in a HUES line of human embryonic stem cells via electroporation. Stem Cells. V. 27. P. 1496. <https://doi.org/10.1002/stem.73>
- Shilina M.A., Grinchuk T.M., Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Alekseenko L.L., Elmuratov A.U., Nikolsky N.N. 2018. Cytogenetic and transcriptomic analysis of human endometrial msc retaining proliferative activity after sublethal heat shock. Cells. V. 7. P. 184. <https://doi.org/10.3390/cells7110184>
- Stultz B.G., McGinnis K., Thompson E.E., Lo Surdo J.L., Bauer S.R., Hursh D.A. 2016. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during *in vitro* culture. Cytother. V. 18. P. 336. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.017>
- Tan Z., Chan Y.J.A., Chua Y.J.K., Rutledge S.D., Pavelka N., Cimini D., Rancati G. 2019. Environmental stresses induce karyotypic instability in colorectal cancer cells. Mol. Biol. Cell. V. 30. P. 42. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0626>
- Ueyama H., Horibe T., Hinotsu S., Tanaka T., Inoue T., Urushihara H., Kitagawa A., Kawakami K. 2012. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. J. Cell Mol. Med. V. 16. P. 72. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01303.x>
- Vinogradov A.E., Shilina M.A., Anatskaya O.V., Alekseenko L.L., Fridlyanskaya I.I., Krasnenko A., Kim A., Korostin D., Ilynsky V., Elmuratov A., Tsyganov O., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. 2017. Molecular Genetic Analysis of Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells That Survived Sublethal Heat Shock. Stem Cells Int. e:2362630. <https://doi.org/10.1155/2017/2362630>
- Zuo W., Xie B., Li C., Yan Y., Zhang Y., Liu W., Huang J., Chen D. 2018. The clinical applications of endometrial mesenchymal stem cells. Biopreserv. Biobank. V. 16. P. 158. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0057>

Stability of the Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells Karyotype *In Vitro*

M. A. Shorokhova^{a,*} and T. M. Grinchuk^a

^a Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: shili-mariya@yandex.ru

The use of stem cells for therapeutic purposes presupposes the significant quantities and genetic stability of the transplanted cells. An increase in cell biomass is may only *in vitro*, which is associated with probable risks of their genetic stability violation. In this work, we analyzed the karyotypic stability of 3 endometrial MSC (eMSC) cell lines after

the transfer of cells in vitro and during subsequent cultivation. We are showing the cells underwent karyotypic changes after transferred to in vitro system. The variability profile of analyzed eMSCs had an individual character. It was found the cells without gross chromosomal changes underwent a reversion to the karyotypic norm. Cells with chromosomal breaks and aneuploidy tended to further destabilize during cultivation. The obtained data make a significant contribution to the eMSC genetic study.

Keywords: MSCs, eMSCs, chromosomes, ectopic conjugation, impaired condensation, chromosomal breakdowns, aneuploidy

УДК 543.552:612.111

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИ ПРОЗРАЧНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИХ ХРАНЕНИИ

© 2021 г. А. К. Евсеев¹, *, А. И. Колесникова¹, И. В. Горончаровская¹, Е. В. Трусова¹, А. И. Костин¹,
А. К. Шабанов¹, М. М. Гольдин², С. С. Петриков¹

¹Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, 129090 Россия

²Колледж Глен Окс Коммьюнити, MI 49032, Центerville, США

*E-mail: anatolevseev@gmail.com

Поступила в редакцию 22.05.2021 г.

После доработки 01.06.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

С помощью электрохимического метода, основанного на использовании оптически прозрачного рабочего электрода, было показано, что в условиях гипотермического (4°C) хранения эритроцитов происходит снижение степени обратимости изменения их формы при воздействии постоянного электрического тока. При катодной поляризации оптически прозрачного рабочего электрода (–0.5 В) доля эритроцитов, перешедших в сфероэритроциты, снизилась с $99.6 \pm 0.4\%$ (1-е сут) до $42.8 \pm 14.5\%$ (42-е сут) ($p < 0.05$), а при анодной поляризации (1.2 В) доля эритроцитов, перешедших в стоматоциты, снизилась с $80.6 \pm 6.7\%$ (1-е сут) до $35.4 \pm 5.6\%$ (42-е сут) ($p < 0.05$). На поздних сроках хранения в образцах наблюдали увеличение числа клеток, подвергавшихся разрушению в условиях воздействия постоянного электрического тока, наличие которых в переливаемой эритроцитарной взвеси может приводить к увеличению свободного гемоглобина в крови реципиента после трансфузии. Полученные результаты могут лечь в основу разработки новых методов оценки качества компонентов крови.

Ключевые слова: оптически прозрачный электрод, оксид индия–олова, эритроцит, деформируемость, морфология

DOI: 10.31857/S0041377121050035

Электрохимические методы, благодаря своей эффективности, простоте и гибкости широко используются не только в различных областях промышленности, но и находят свое применение в медицине и биологии (Djokić, 2016). Особого внимания заслуживают исследования поведения живых клеток при контакте с чужеродными заряженными материалами, позволяющие расширить представление о процессах функционирования клеток. Начиная с 50-х гг. прошлого века, проводились многочисленные исследования взаимодействия клеток с электропроводными материалами (например, платиной, золотом, стеклоуглеродом, активированным углем), результатом которых стало описание электрохимической природы ряда фундаментальных процессов (тромбогенеза, адгезии и пролиферации клеток) (Sawyer, 1983; Kojima et al., 1991), а также разработка принципов оценки гемосовместимости материалов (Sawyer, 1984).

Выйти на качественно новый уровень в данных исследованиях позволило внедрение оптически прозрачных электродов, используемых преимуще-

ственно при производстве жидкокристаллических дисплеев и солнечных батарей (Ellmer, 2012). При этом, в качестве оптически прозрачных электродов могут применяться как классические металлические электроды, например, тонкие слои серебра или меди (Bi et al., 2019), так и нанесенные на прозрачную подложку другие электропроводные материалы: углеродные нанотрубки (López-Naranjo et al., 2016), оксид графена (Woo, 2019), электропроводные полимеры (Hofmann et al., 2018). Однако наибольшее распространение получили оптически прозрачные электроды на основе оксидов индия и олова (ITO) (Cao et al., 2014; Afre et al., 2018), обладающие достаточно высоким светопропусканием (80–95%) при относительно низком сопротивлении (10–50 Ом/см²) (Cao et al., 2014).

Благодаря возможности визуализации функционирования клеток в условиях их контакта с поверхностью заряженного электрода, было показано влияние потенциала оптически прозрачного электрода на морфологию и рост живых клеток HeLa (Yaoita et al., 1990), морфологию эндотелиальных клеток бычьей аорты (Wong et al., 1994), а также на способность к

Принятые сокращения: ITO – indium tin oxide

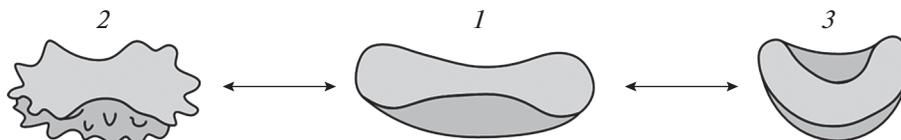


Рис. 1. Изменение морфологии эритроцита: 1 – дискоцит, 2 – эхиноцит, 3 – стоматоцит.

адгезии и росту культуры *Pseudomonas fluorescens* (Busalmen, de Sánchez, 2005). Однако более перспективными представляются исследования клеток крови, например, эритроцитов. Особого внимания заслуживает разработка и внедрение в клиническую практику новых методов анализа эритроцит-содержащих компонентов крови.

В настоящее время обеспечение сохранности свойств эритроцитов в процессе их хранения для переливания является весьма важной задачей. По стандартам РФ и рекомендациям ВОЗ хранить эритроцитсодержащие компоненты допускается при температуре 2–6°C не более 35 сут (в зависимости от используемого консерванта) со дня забора крови (Mvere et al., 2005; Рагимов, 2010). Для США и Канады такой срок составляет до 42 сут (Wang et al., 2012; Koch et al., 2013; Bhaduri et al., 2014). При этом критериями пригодности эритроцитсодержащих компонентов для трансфузии являются тест на концентрацию гемоглобина, определение гематокрита и степени гемолиза эритроцитов (Постановление Правительства РФ № 797, 2019). Однако на основании этих данных нельзя сделать выводы о структурной и функциональной полноценности эритроцитов.

Одним из важнейших свойств эритроцита, обеспечивающего газотранспортную функцию, является его способность к деформации, которая обеспечивается взаимодействием интегральных белков (гликофориннов, белка полосы 3) и периферических компонентов (спектрина, актина и др.) мембрано-цитоскелетного комплекса. Деформируемость эритроцитов претерпевает значительные изменения с их возрастом (Ламзин и др., 2014) и по выраженности изменения можно судить о деструктивных процессах при старении эритроцитов *in vitro* (Kirkpatrick et al., 1998; Lutten et al., 2008; Hess, 2010; Мороз и др., 2013), которые могут являться причиной развития трансфузионных осложнений (Moore et al., 1997; Bennett-Guerrero et al., 2007; Kim et al., 2015).

Еще одной важной характеристикой эритроцита является величина поверхностного заряда мембраны эритроцита (Левин, Сухарева, 2015), отрицательное значение которого (в норме около –15 мВ; Jan, Chien 1973), обуславливаемое присутствием сиаловых кислот в олигосахаридных цепях гликофориннов, становится менее отрицательным при хранении.

В целом, механизмы, лежащие в основе изменения деформации эритроцитов, пока остаются неясными. Наблюдаемые изменения в процессе старе-

ния эритроцитов связывают с необратимой агрегацией спектрина и гемоглобина, которая вызывает нарушение структуры эритроцитов и их пластичности. Однако основной причиной считают окисление мембраны эритроцита при хранении под влиянием активных форм кислорода (D'Amici et al., 2007).

Изменение двойного электрического слоя у мембраны эритроцита за счет влияния различных внешних факторов оказывает влияние на морфологию эритроцитов (переход эхиноцит ↔ дискоцит ↔ стоматоцит (рис. 1)). Данный механизм трансформации формы клеток реализуется благодаря электрохимическим процессам и не вступает в противоречие с широко распространенной теорией бислоистой пары (Tachev et al., 2004).

Кроме того, было обнаружено влияние заряда поверхности инородного тела на изменение морфологии эритроцита. Так, было описано явление агрегации (слипания) эритроцитов при контакте с положительно заряженным электродом, но механизм наблюдаемого явления для авторов остался неясным (Ci et al., 1998).

Ранее было показано, что сочетание электрохимических и микроскопических методов исследования позволяет оценить морфологию эритроцитов при контакте с поверхностью заряженного электрода (Tsvadze et al., 2017). Так, в области потенциалов отрицательнее –250 мВ наблюдали переход морфологических форм эритроцита из дискоцита в эхиноцит, в области потенциалов положительнее 600 мВ наблюдали переход из дискоцита в стоматоцит.

Можно предположить, что изменение морфологии эритроцита и потеря части отрицательного заряда при старении может привести к изменению характера взаимодействия эритроцитов с заряженной поверхностью электрода.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния гипотермического хранения эритроцитов на степень обратимости изменения их формы при воздействии постоянного электрического тока.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал. В работе использовали эритроцитарную взвесь 5 практически здоровых доноров от 27 до 35 лет, заготовленную на гемоконсерванте ЦФД и С.А.Г.М. (MacoPharma, Франция) в отделении производственной трансфузиологии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Образцы хранили

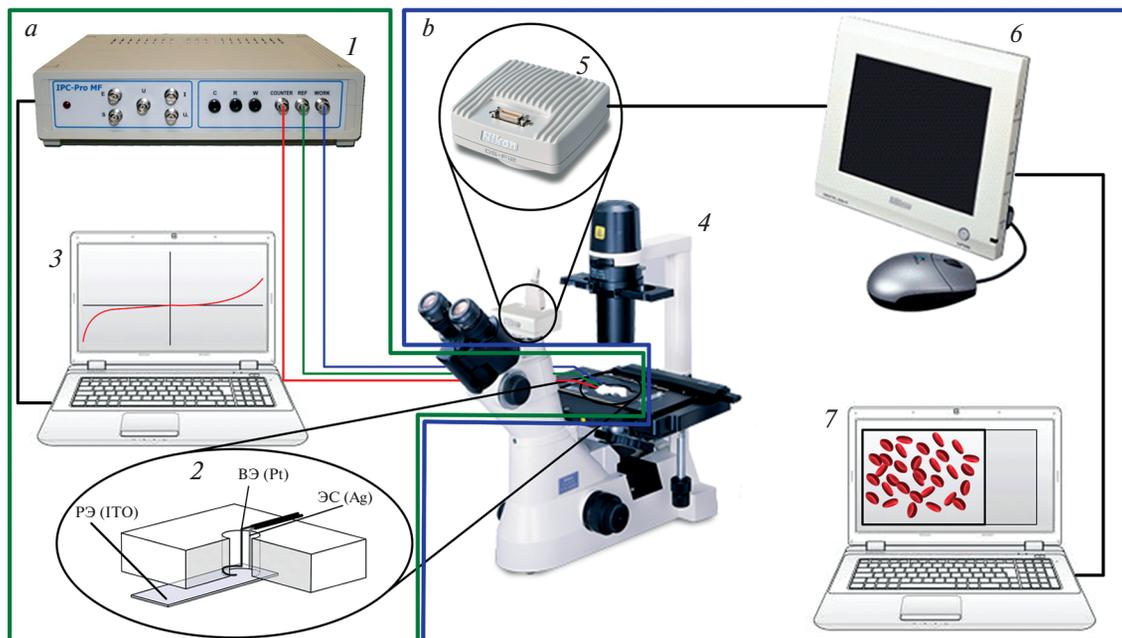


Рис. 2. Схема установки для исследования влияния внешней поляризации постоянным током на морфологию эритроцитов: 1 – потенциостат; 2 – электрохимическая ячейка: РЭ – рабочий электрод, ВЭ (Pt) – вспомогательный электрод, ЭС (Ag) – электрод сравнения; 3 – компьютер для управления электрохимическим блоком, 4 – инвертированный микроскоп, 5 – цифровая камера, 6 – цифровая рамка, 7 – компьютер для управления оптическим блоком.

при температуре 4°C в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

Экспериментальная установка. В работе использовали установку, состоящую из электрохимического (рис. 2а) и оптического (рис. 2б) блоков. Электрохимический блок состоял из трехэлектродной электрохимической ячейки (рис. 2, позиция 2) с рабочим оптически прозрачным ИТО-электродом, расположенным на дне ячейки, серебряной проволокой, покрытой хлоридом серебра (в качестве электрода сравнения), и платиновой проволокой в качестве вспомогательного электрода. Потенциал рабочего электрода устанавливали и контролировали с помощью потенциостата IPC-Pro MF (Кронас, Россия) (рис. 2, позиция 1). Морфологию в режиме реального времени исследовали в проходящем свете на инвертированном микроскопе Eclipse TS100 (Nikon, Япония), объектив CFI S Plan Fluor ELWD 60×/0.70 (Nikon, Япония), с цифровой 5.0 Мрiх камерой DS-Fi1 и цифровой рамкой DS-L2 (Nikon, Япония) (рис. 2, позиции 4–6).

Анализ суспензии эритроцитов. В электрохимическую ячейку вносили 0.1 мл суспензии эритроцитов, полученной добавлением к 10 мл 0.15 М раствора NaCl (рН 7.2) 0.01 мл эритроцитарной взвеси. Для обеспечения осаждения эритроцитов на поверхности оптически прозрачного электрода измерения начинали через 15 мин. Поляризацию рабочего электрода осуществляли в потенциодинамическом режиме со скоростью развертки потенциала 10 мВ/с от бестокового потенциала до достижения потенциала

–0.5 В при движении в катодную область и до потенциала 1.2 В при движении в анодную область. Одновременно с началом изменения потенциала рабочего электрода запускали запись на цифровую камеру инвертированного микроскопа, фиксирующего морфологию эритроцитов, находящихся на поверхности оптически прозрачного рабочего электрода. По завершении работы потенциостата запись прекращалась. Исследование эритроцитарной взвеси проводили на 1, 5, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 сут хранения.

Анализ монослойных мазков эритроцитарной взвеси. Монослойные мазки эритроцитарной взвеси, взятые в те же сутки хранения, исследовали по стандартной методике на микроскопе AxioStar PLUS (Carl Zeiss, Германия), объектив CP-Achromat 100×/1.25 Oil (Carl Zeiss, Германия).

Оценка деформируемости эритроцитов. Деформируемость эритроцитов оценивали фильтрационным методом (Закутский и др., 2001), основанным на определении показателя деформируемости (Z) по значениям диаметров физиологического раствора и пятна эритроцитарной массы на бумажном фильтре:

$$Z = ((D_{\text{эп}} - D_{\text{ср}}) / D_{\text{фр}}) \times 100\%,$$

где Z – показатель деформируемости эритроцитов, $D_{\text{эп}}$ – диаметр пятна суспензии эритроцитов, $D_{\text{ср}}$ – диаметр периферического кольца суспензии деформированных эритроцитов, $D_{\text{фр}}$ – диаметр пятна физиологического раствора.

Статистическая обработка. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с ис-

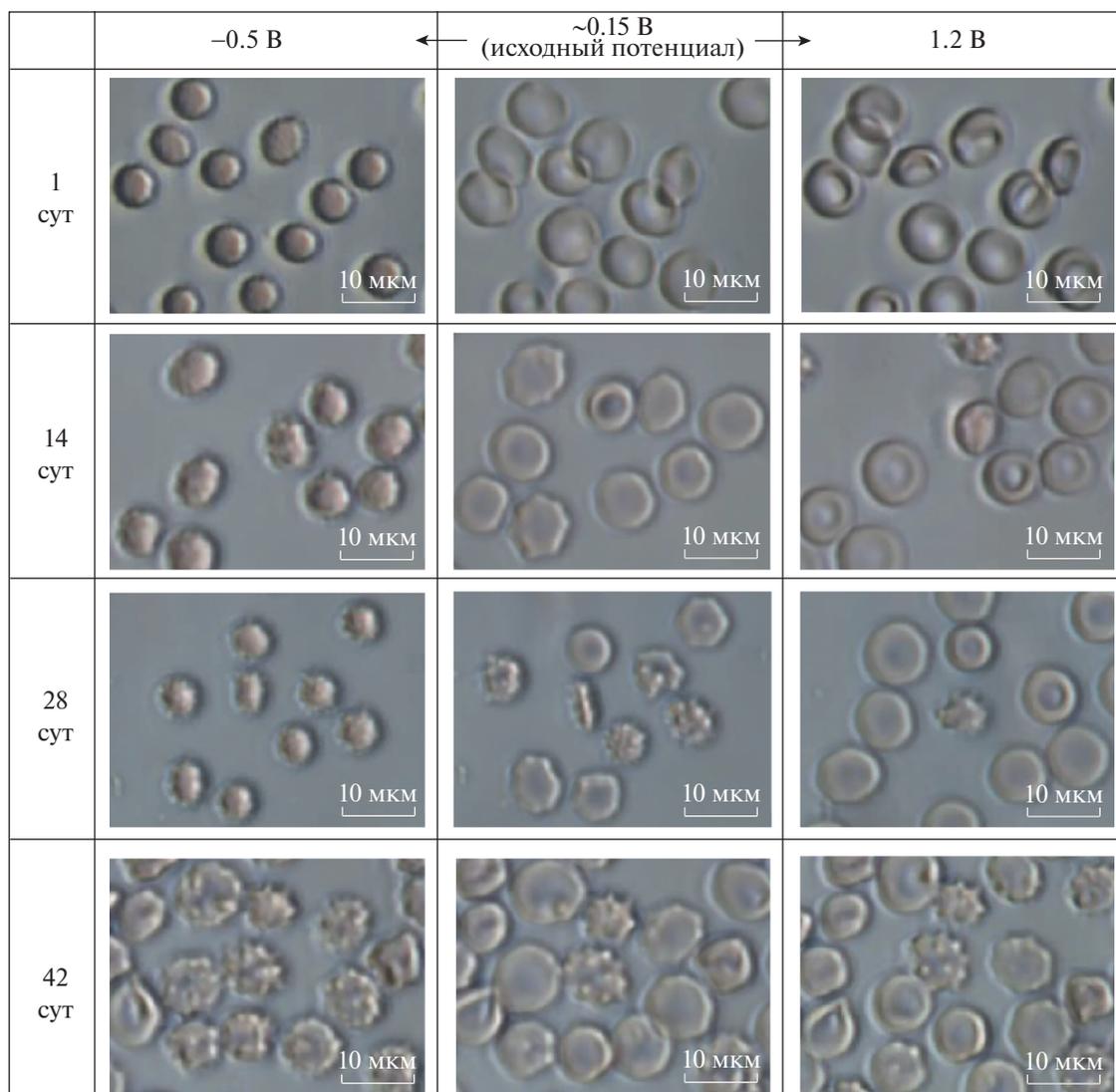


Рис. 3. Морфология эритроцитов в различные сроки хранения при стационарном потенциале и значениях потенциала -0.5 и 1.2 В. Увел. об.: $600\times$. Масштабная линейка: 10 мкм.

пользованием программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft). Описательная статистика количественных признаков представлена в виде среднего значения и ошибки среднего. Для оценки достоверности различий изменения морфологии эритроцитов в процессе их хранения использовали критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании эритроцитов разных сроков хранения, осевших из суспензии на поверхность оптически прозрачного электрода, было обнаружено, что их морфология в отсутствие внешней поляризации рабочего электрода (смещения его потенциала в область катодных или анодных значений потенциа-

лов при постоянном токе) совпадала с полученными нами аналогичными результатами микроскопии мазков эритроцитарной взвеси. Совпадение было и с данными из литературы (Blasi et al., 2012; Мороз и др., 2013), а именно: снижалось содержание дискоцитов и увеличивалось содержание эхиноцитов по мере увеличения срока хранения (рис. 3).

В то же время, в условиях внешней поляризации рабочего электрода наблюдали не только изменение морфологии эритроцитов в ответ на внешнее воздействие электрическим током, но и изменения соотношения морфологических форм эритроцитов с увеличением срока хранения эритроцитарной взвеси как в условиях катодной, так и анодной поляризации рабочего электрода (рис. 3, табл. 1).

В суспензии эритроцитов в 1-е сут хранения, когда общее состояние клеток можно характеризовать

Таблица 1. Морфологические формы эритроцитов в разные сроки хранения эритроцитарной взвеси при стационарном потенциале и значениях потенциала -0.5 и 1.2 В

Срок хранения, сут	Количество морфологических форм, %		Величина потенциала электрода, В		
			-0.5	~ 0.15 (исходный)	1.2
1	Дискоциты		0	91.80 ± 0.97	15.20 ± 5.12
	Эхиноциты	I	0.20 ± 0.20	6.20 ± 0.58	3.80 ± 2.17
		II	0	2.00 ± 0.45	0.40 ± 0.45
		III	0.20 ± 0.20	0	0
	Сфероэхиноциты		99.6 ± 0.40	0	0
	Стоматоциты		0	0	80.60 ± 6.72
14	Дискоциты		0	$61.00 \pm 1.73^{a, б}$	18.20 ± 1.46
	Эхиноциты	I	0	$18.00 \pm 2.98^{a, б}$	9.00 ± 1.05
		II	2.80 ± 1.07	$11.40 \pm 1.12^{a, б}$	7.00 ± 0.89^a
		III	$16.20 \pm 1.16^{a, б}$	$8.40 \pm 0.75^{a, б}$	3.00 ± 0.89^a
	Сфероэхиноциты		81.00 ± 1.70^a	1.20 ± 0.58	0.60 ± 0.40
	Стоматоциты		0	0	$62.20 \pm 2.80^{a, б}$
28	Дискоциты		0.20 ± 0.20	$25.80 \pm 2.18^{a, б}$	18.60 ± 2.14
	Эхиноциты	I	0.20 ± 0.20	24.40 ± 0.68^a	10.60 ± 1.57
		II	4.80 ± 0.86^a	$25.40 \pm 1.44^{a, б}$	$11.00 \pm 1.63^{a, б}$
		III	$45.80 \pm 2.54^{a, б}$	$20.00 \pm 1.30^{a, б}$	$8.40 \pm 1.12^{a, б}$
	Сфероэхиноциты		$48.60 \pm 2.11^{a, б}$	4.00 ± 0.71^a	3.40 ± 0.82^a
	Стоматоциты		0.40 ± 0.24	0.40 ± 0.24	$48.00 \pm 2.30^{a, б}$
42	Дискоциты		2.40 ± 1.12	$15.00 \pm 1.70^{a, б}$	20.40 ± 2.93
	Эхиноциты	I	8.00 ± 4.23	$20.20 \pm 0.97^{a, б}$	14.40 ± 1.60^a
		II	17.20 ± 6.87^a	31.00 ± 2.30^a	12.20 ± 1.77^a
		III	$26.20 \pm 5.15^{a, б}$	$25.20 \pm 2.39^{a, б}$	12.60 ± 1.69^a
	Сфероэхиноциты		42.80 ± 14.49^a	5.00 ± 1.61	5.00 ± 1.79
	Стоматоциты		3.40 ± 1.44	3.60 ± 1.50	35.40 ± 5.56^a

Примечание. Показаны средние значения и их ошибки. Различия достоверны при $p < 0.05$ относительно (^a) 1-х сут и (^б) относительно предыдущего срока (критерий Уилкоксона).

как нормальное (рис. 3), при смещении потенциала ИТО электрода в область более отрицательных значений наблюдали переход морфологических форм эритроцита из дискоцита в сфероцит с поочередным прохождением всех стадий эхиноцитоза (эхиноцит I, II, III, сфероэхиноцит). Названия морфологических форм даны согласно данным из литературы (Bessis, 1973). Так, при потенциале -0.5 В все эритроциты представлены, как правило, сфероэхиноцитами. В то же время, при смещении потенциала в область более положительных значений наблюдали переход из дискоцита в стоматоцит. При потенциале 1.2 В клетки были представлены преимущественно стоматоцитами.

Морфологические переходы как в сторону эхиноцитов, так и в сторону стоматоцитов, являются обратимыми, т.е. при смене направления развертки по-

тениала или при отключении поляризации морфологическая форма клеток возвращается к исходному состоянию.

С увеличением срока хранения в случае катодной поляризации снижалось количество сфероэхиноцитов и повышалось количество эхиноцитов III. Так, если в 1-е сут при -0.5 В доля эритроцитов, представленных сфероэхиноцитами, составляла $99.6 \pm 0.4\%$, то к 42-м сут доля сфероэхиноцитов составила $42.8 \pm 14.5\%$.

В условиях анодной поляризации с увеличением срока хранения эритроцитарной взвеси был обнаружен ряд особенностей. Во-первых, доля эритроцитов, перешедших в стоматоциты, снизилась с $80.6 \pm 6.7\%$ (1-е сут) до $35.4 \pm 5.6\%$ (42-е сут). Во-вторых, в этой области потенциалов обнаружено явление перехода из эхиноцита II и III в эхиноцит I или морфо-

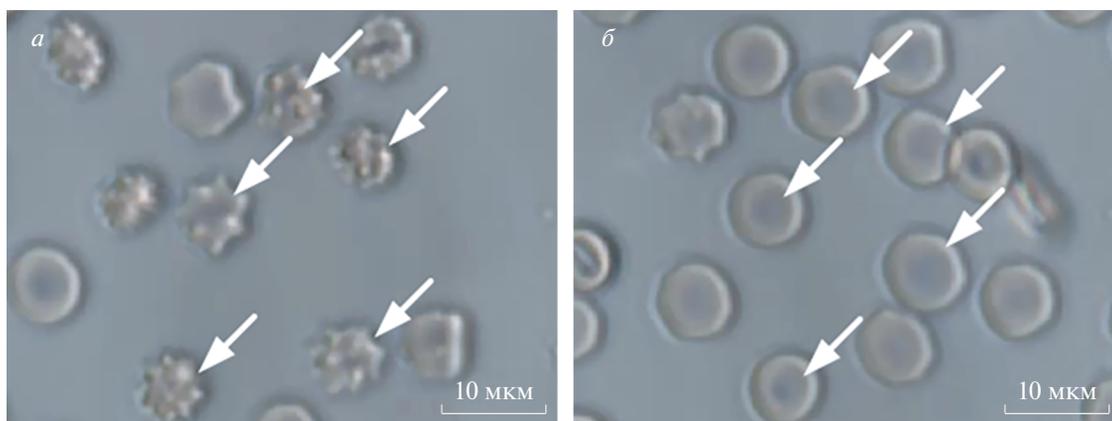


Рис. 4. Морфология эритроцитов через 28 сут хранения в отсутствие внешней поляризации постоянным током (а) и при величине потенциала ИТО-электрода 1.2 В (б). Стрелки показывают эхиноциты, перешедшие в форму, близкую к дискоциту. Увел. об.: 600×.

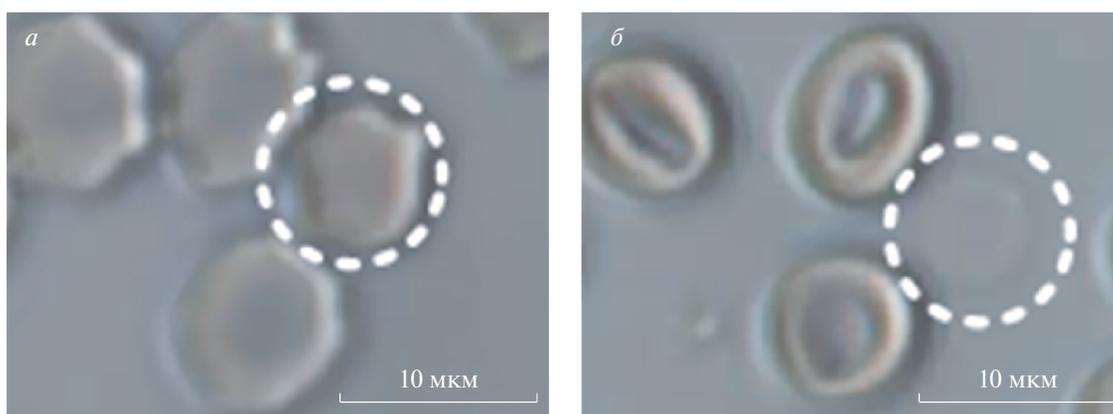


Рис. 5. Морфология эритроцитов на 35-е сут хранения в отсутствие внешней поляризации постоянным током (а) и при величине потенциала ИТО электрода 1.2 В (б). Увел. об.: 600×. Кругжками выделены клетки, подвергшиеся разрушению.

логическую форму, близкую к дискоциту, что более подробно показано на примере морфологии эритроцитов на 28-е сут хранения (рис. 4).

Немаловажным, с нашей точки зрения, наблюдением является то, что с увеличением срока хранения в обследованных образцах возрастало количество клеток, подвергшихся разрушению при воздействии электрического тока (рис. 5). При этом на поверхности электрода можно видеть тени эритроцитов (рис. 5б).

Наличие в эритроцитарной взвеси клеток с измененными физическими свойствами под влиянием длительного гипотермического хранения может привести к внутрисосудистому гемолизу (вследствие их низкой механической прочности) в организме реципиента и увеличению содержания свободного гемоглобина в крови после трансфузии.

Ранее в ряде исследований было показано, что с увеличением срока хранения эритроцитарной взвеси возрастает количество функционально непригодных клеток (Weinberg, Patel, 2016) и концентрация

свободного гемоглобина в крови реципиента после трансфузии (Windsant et al, 2012), что является причиной развития ряда серьезных осложнений (Schaer et al., 2013), например, острой почечной недостаточности (Deuel et al., 2016).

В настоящее время степень гемолиза хранящихся эритроцитсодержащих компонентов не должна превышать 0.8% в конце срока хранения, что регламентируется «Правилами заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов» (Постановление Правительства РФ № 797, 2019). Этот показатель определяется по концентрации свободного гемоглобина в супернатанте эритроцитарной взвеси после центрифугирования фотометрическим методом с использованием специализированных анализаторов, например, HemoCue Plasma/Low Hb (HemoCue, Швеция). Таким образом, учитывается только доля разрушенных эритроцитов за период хранения, без применения дополнительных методов контроля состояния клеток.

Одним из предположений, объясняющих вышеописанные явления изменений морфологии эритроцитов в условиях внешней поляризации рабочего электрода, может быть зависимость морфологического ответа клеток от деформируемости эритроцита. Однако данное предположение не подтвердилось, поскольку при экспериментальной оценке деформируемости эритроцитов фильтрационным методом достоверное различие показателя деформируемости (критерий Уилкоксона, $p < 0.05$) было зафиксировано только к 42 сут. При этом за весь срок хранения данный показатель снизился примерно на 5% — с 38.34 ± 0.42 отн. ед. (1 сут) до 37.15 ± 0.76 отн. ед. (42 сут).

Таким образом, электрохимический метод с использованием оптически прозрачного электрода позволяет не только получить качественную картину изменения обратимости морфологии эритроцитов в условиях гипотермического хранения, но и выявлять в исследуемых образцах наличие функционально непригодных эритроцитов.

Внедрение аналитических методов, основанных на использовании оптически прозрачных электродов, открывает новые возможности в диагностике состояния клеток, что может впоследствии лечь в основу разработки новых методов оценки качества компонентов крови.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы (№ 004.20.22).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Используемые в работе образцы эритроцитарной взвеси были заготовлены в отделении производственной трансфузиологии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Каждый донор подписывал информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Закутский А.В., Радужекевич В.Л., Пастухова Л.Ю., Белошецкий В.А.* 2001. Способ оценки деформируемости эритроцитов. Патент РФ № 2173461. (*Zakutsky A.V., Radushkevich V.L., Pastukhova L.Yu., Beloshevsky V.A.* 2001. A method for assessing the deformability of erythrocytes. Patent RF № 2173461.)
- Ламзин И.М., Хайруллин Р.М., Ханман М.Э.* 2014. Оценка структуры популяции эритроцитов эритроцитсодержащих сред, находящихся на хранении в банке крови, по данным атомно-силовой микроскопии. Вестник совр. клин. мед. Т. 7. № 5. С. 16. (*Lamzin I.M., Khayrullin R.M., Hanman M.E.* 2014. A analysis of changes population structure of stored red blood cells using atomic force microscopy. Vestnik Sovremennoi Klinicheskoi Mediciny. V. 7. № 5. P. 16.)
- Левин Г.Я., Сухарева Е.Г.* 2015. Изменение электрокинетических свойств эритроцитов при их консервации. Гематология и трансфузиология. Т. 60. № 1. С. 21. (*Levin G.Ya., Sukhareva E.G.* 2015. Changes in erythrocyte electrokinetic characteristics after their preservation. Russ. J. Hematol. Transfusiol. V. 60. № 1. P. 21.)
- Мороз В.В., Голубев А.М., Козлова Е.К., Афанасьев А.В., Гудкова О.Е., Новодержкина И.С., Марченков Ю.В., Кузовлев А.Н., Заржецкий Ю.В., Костин А.И., Волков Д.П., Яковлев В.Н.* 2013. Динамика морфологических изменений эритроцитов и биохимических показателей консервированной цельной крови в различные сроки хранения. Общая реаниматология. Т. 9. № 1. С. 5. (*Moroz V.V., Golubev A.M., Kozlova E.K., Afanasyev A.V., Gudkova O.E., Novodержкина I.S., Marchenkov Yu.V., Kuzovlev A.N., Zarzhetsky Yu.V., Kostin A.I., Volkov D.P., Yakovlev V.N.* 2013. Time course of morphological changes in red blood cells and banked whole blood biochemical parameters in different storage periods. Gen. Reanimatol. (Russ.). V. 9. № 1. P. 5) <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2013-1-5>
- Рагимов А.А., Шербаклова Г.Н.* 2010. Инфузионно-трансфузионная терапия: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. (*Ragimov A.A., Scherbakova G.N.* 2010. Infusion-transfusion therapy: A guide. Moscow: GEOTAR-Media.)
- Afre R.A., Sharma N., Sharon M., Sharo M.* 2018. Transparent conducting oxide films for various applications: A review. Rev. Adv. Mater. Sci. V. 53. P. 79.
- Bennett-Guerrero E., Veldman T.H., Doctor A., Telen M.J., Ortel T.L., Reid T.S., Mulherin M.A., Zhu H., Buck R.D., Califf R.M., McMahon T.J.* 2007. Evolution of adverse changes in stored RBCs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 104. P. 17063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708160104>
- Bessis M.* 1973. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. In: Red cell shape. Berlin: Springer. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-642-88062-9_1
- Bhaduri B., Kandel M., Brugnara C., Tangella K., Popescu G.* 2014. Optical assay of erythrocyte function in banked blood. Sci. Rep. V. 4. Article 6211. <https://doi.org/10.1038/srep06211>
- Bi Y.G., Liu Y.F., Zhang X.L., Yin D., Wang W.Q., Feng J., Sun H.B.* 2019. Ultrathin metal films as the transparent electrode in ITO-free organic optoelectronic devices. Adv. Opt. Mater. V. 7. Article 1800778. <https://doi.org/10.1002/adom.201800778>
- Blasi B., D'Alessandro A., Ramundo N., Zolla L.* 2012. Red blood cell storage and cell morphology. Transfus. Med. V. 22. P. 90 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2012.01139.x>
- Busalmen J.P., de Sánchez S.R.* 2005. Electrochemical polarization-induced changes in the growth of individual cells and biofilms of fluorescens (ATCC 17552). Appl. Environ. Microbiol. V. 71. P. 6235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6235-6240.2005>
- Cao W., Li J., Chen H., Xue J.* 2014. Transparent electrodes for organic optoelectronic devices: A review. J. Photonics Energy. V. 4. Article 040990. <https://doi.org/10.1117/1.JPE.4.040990>

- Ci Y.X., Li H.N., Feng J.* 1998. Electrochemical method for determination of erythrocytes and leukocytes. *Electroanalysis*. V. 10. P. 921.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4109\(199810\)10:13<921::AID-ELAN921>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(199810)10:13<921::AID-ELAN921>3.0.CO;2-4)
- D'Amici G.M., Rinalducci S., Zolla L.* 2007. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J. Proteome Res.* V. 6. P. 3242.
<https://doi.org/10.1021/pr070179d>
- Deuel J.W., Schaer C.A., Boretti F.S., Opitz L., Garcia-Rubio I., Baek J.H., Spahn D.R., Buehler P.W., Schaer D.J.* 2016. Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response. *Cell Death Dis.* V. 7. P. e2064.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2015.392>
- Djokić S.* 2016. Biomedical and pharmaceutical applications of electrochemistry. Springer Int. Publ.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-31849-3>
- Ellmer K.* 2012. Past achievements and future challenges in the development of optically transparent electrodes. *Nat. Photonics*. V. 6. P. 809.
<https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.282>
- Hess J.R.* 2010. Red cell changes during storage. *Transfus. Apher. Sci.* V. 43. P. 51.
<https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>
- Hofmann A.I., Cloutet E., Hadziioannou G.* 2018. Materials for transparent electrodes: From metal oxides to organic alternatives. *Adv. Opt. Mater.* V. 4. Article 1700412.
<https://doi.org/10.1002/aelm.201700412>
- Jan K.M., Chien S.* 1973. Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J. Gen. Physiol.* V. 61. P. 638.
<https://doi.org/10.1085/jgp.61.5.638>
- Kim J., HoYoon L., Shin S.* 2015. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *J. Cell. Biotechnol.* V. 1. P. 63.
<https://doi.org/10.3233/JCB-15007>
- Kirkpatrick U.J., Adams R.A., Lardi A., McCollum C.N.* 1998. Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *Br. J. Haematol.* V. 101. P. 364.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00689.x>
- Koch C.G., Figueroa P.I., Li L., Sabik J.F., Mihaljevic T., Blackstone E.H.* 2013. Red blood cell storage: how long is too long? *Ann. Thorac. Surg.* V. 96. P. 1894.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.05.116>
- Kojima J., Shinohara H., Ikariyama Y., Aizawa M., Nagaike K., Morioka S.* 1991. Electrically controlled proliferation of human carcinoma cells cultured on the surface of an electrode. *J. Biotechnol.* V. 18. P. 129.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90241-M](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90241-M)
- López-Naranjo E.J., González-Ortiz L.J., Apátiga L.M., Rivera-Muñoz E.M., Manzano-Ramírez A.* 2016. Transparent electrodes: A review of the use of carbon-based nanomaterials. *J. Nanomater.* V. 2016. Article 4928365.
<https://doi.org/10.1155/2016/4928365>
- Luten M., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Schaap N.P. de Grip W.J., Bos H.J., Bosman G.J.C.G.M.* 2008. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion.* V. 48. P. 1478.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01734.x>
- Mvere D., Vinelli E., Bond K.* 2005. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. Geneva: World Health Organization.
- Moore F.A., Moore E.E., Sautia A.* 1997. Blood transfusion: An independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch. Surg.* V. 132. P. 620.
- Sawyer P.N.* 1983. The relationship between surface charge (potential characteristics) of the vascular interface and thrombosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* V. 416. P. 561.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb35212.x>
- Sawyer P.N.* 1984. Electrode-biologic tissue interactions at interfaces – a review. *Biomater. Med. Devices Artif. Organs.* V. 12. P. 161.
<https://doi.org/10.3109/10731198409118831>
- Schaer D.J., Buehler P.W., Alayash A.I., Belcher J.D., Vercellotti G.M.* 2013. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood.* V. 121. P. 1276.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-451229>
- Tachev K.D., Danov K.D., Kralchevsky P.A.* 2004. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* V. 34. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.12.011>
- Tsivadze A.Yu., Khubutiya M.Sh., Goroncharovskaya I.V., Evseev A.K., Goldin Michael M., Borovkova N.V., Batishchev O.V., Goldin Mark M.* 2017. Electron transport and morphological changes in the electrode/erythrocyte system. *Mendeleev Commun.* V. 27. P. 183.
<https://doi.org/10.1134/S0012501617110021>
- Wang D., Sun J., Solomon S.B., Klein H.G., Natanson C.* 2012. Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion.* V. 52. P. 1184.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03466.x>
- Weinberg J.A., Patel R.P.* 2016. Red blood cell transfusion and its effect on microvascular dysfunction in shock states. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* V. 30. P. 491.
<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2016.10.005>
- Windsant I.C.V., de Wit N.C.J., Sertorio J.T.C., Beckers E.A.M., Tanus-Santos J.E., Jacobs M.J., Buurman W.A.* 2012. Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study. *Crit. Care.* V. 16. Article R95.
<https://doi.org/10.1186/cc11359>
- Wong J.Y., Langer R., Ingber D.E.* 1994. Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91. P. 3201.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3201>
- Woo Y.S.* 2019. Transparent conductive electrodes based on graphene-related materials. *Micromachines (Basel).* V. 10. Article 13.
<https://doi.org/10.3390/mi10010013>
- Yaoita M., Ikariyama Y., Aizawa M.* 1990. Electrical effects on the proliferation of living HeLa cells cultured on optically transparent electrode surface. *J. Biotechnol.* V. 14. P. 321.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90116-S](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90116-S)

Use of Optically Transparent Electrodes for the Assessment of the Erythrocytes Quality during Their Storage

A. K. Evseev^{a,*}, A. I. Kolesnikova^a, I. V. Goroncharovskaya^a, E. V. Trusova^a, A. I. Kostin^a, A. K. Shabanov^a, M. M. Goldin^b, and S. S. Petrikov^a

^a Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Department of Moscow Health Ministry, Moscow, 129090 Russia

^b Glen Oaks Community College, Centreville, MI 49032, 62249 Shimmel Road, USA

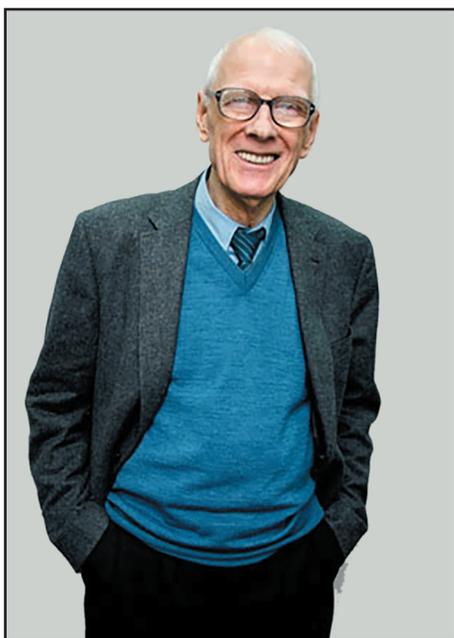
*e-mail: anatolevseev@gmail.com

Using an electrochemical method based on the use of an optically transparent working electrode, it was shown that during the erythrocytes storage under hypothermic conditions (4°C), the degree of reversibility of shape changes decreases when exposed to direct electrical current. With the cathodic polarization of the optically transparent working electrode (−0.5 V), the proportion of erythrocytes converted to spherocytocytes decreased from 99.6 ± 0.4% (1st day) to 42.8 ± 14.5% (42nd day) ($p < 0.05$), and with anodic polarization (1.2 V) the proportion of erythrocytes converted to stomatocytes decreased from 80.6 ± 6.7% (1st day) to 35.4 ± 5.6% (42nd day) ($p < 0.05$). At the later stages of storage, an increase in the number of cells that underwent destruction under the influence of direct electrical current was observed in the samples. The presence of such cells in transfused packed red blood cells can lead to an increase in plasma free hemoglobin levels in the recipient after transfusion. The results obtained may form the basis for the development of new methods for assessing the quality of blood components.

Keywords: optically transparent electrode, indium tin oxide, erythrocyte, deformability, morphology

ПАМЯТИ НИКОЛАЯ НИКОЛАЕВИЧА НИКОЛЬСКОГО (1931–2021)

DOI: 10.31857/S0041377121050084



28 апреля 2021 г. после тяжелой продолжительной болезни на 90-м году жизни скончался академик РАН Николай Николаевич Никольский, научный руководитель Института цитологии РАН, заведующий Отделом внутриклеточной сигнализации и транспорта, главный редактор журнала “Цитология”. Трудно переоценить роль Николая Николаевича в становлении и успешной работе Института.

Николай Николаевич родился 9 сентября 1931 г. в Ленинграде. В 1954 г. он с отличием окончил Ленинградский государственный университет по специальности “физиология человека и животных”. В 1957 г. на базе Лаборатории физиологии клетки Зоологического института АН СССР был организован Институт цитологии АН СССР. Первым директором ИИЦ РАН был выдающийся ученый Дмитрий Николаевич Насонов, приведший в Институт как зрелых исследователей, так и целую когорту молодых студентов и аспирантов, среди которых был и Николай Николаевич. Возможно, обилие молодежи и создало в конечном итоге особую “студенческую” атмосферу Института (“ЦИНа”) – простую, демократичную, дружелюбную. И вся научная жизнь Н.Н. Никольского оказалась связана с Институтом, в котором он прошел путь от старшего лаборанта и аспиранта до заведующего сначала лабораторией

(Лабораторией физиологии клеточного цикла, преобразованной затем в Отдел), а потом и всего Института. Пост директора Института Николай Николаевич занимал с 1988 по 2004 г., с 2012 по 2015 гг. исполнял обязанности директора, а затем был избран научным руководителем Института. Его вклад в поддержание “циновской атмосферы” и сохранение ее традиций невозможно переоценить.

Руководящие способности и особенности личности Николаевича проявились очень рано, когда он стал секретарем партийной организации Института и выполнял эти обязанности в течение многих лет, не раз отстаивая перед партийными верхами свою точку зрения на текущие вопросы, за что его сразу же оценил коллектив, но недолголюбиво партийное начальство. Он не раз повторял, что “директорство” в те годы было намного труднее, чем в последующие, когда исчезла главенствующая роль партийного руководства.

Первый этап научного творчества Н.Н. Никольского был связан с разработкой фундаментальных проблем мембранного транспорта, что способствовало становлению и развитию мембранной биологии в СССР. Им впервые в нашей стране были развернуты широкие исследования мембранного транспорта неэлектролитов, сахаров и аминокислот в клетках животных. Эти исследования были суммированы в докторской диссертации “Регуляция транспорта сахаров в мышечной ткани”, за которую в 1973 г. Никольскому была присвоена степень доктора биологических наук. Николай Николаевич всегда старался внедрять и развивать и в своей лаборатории, и в Институте в целом, новые методы (подчас дорогостоящие) и новые научные направления, стремясь не отставать от быстрого развития мировой клеточной биологии. В конце 1970-х гг. Николай Николаевич совместно с Г.П. Пинаевым активно осваивал и внедрял новый для Института объект исследований – клеточные культуры, что в итоге увенчалось возникновением в Институте Отдела клеточных культур (1974) и Коллекции культур клеток позвоночных (1978). В начале 80-х гг. научный интерес Николая Николаевича оказался связан с еще одной “горячей точкой” клеточной биологии, а именно с проблемами регуляции клеточной пролиферации. Работы по изучению внутриклеточной сигнализации рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) развивались в рамках созданного им коллектива Лаборатории физиологии клеточного цикла

(ЛФКЦ). Проблемы внутриклеточного процессинга ЭФР-рецепторных комплексов, экспериментальные доказательства пролиферативного действия ЭФР на клетки в культуре и в условиях организма, связь с процессом канцерогенеза и другие вопросы рассмотрены Никольским в коллективной монографии: Никольский Н.Н., Соркин А.Д., Сорокин А.Б. Эпидермальный фактор роста. Л.: Наука, 1987. 200 с. На основе ЛФКЦ позднее возник Отдел внутриклеточной сигнализации и транспорта, которым Никольский руководил до конца жизни.

На рубеже веков основные научные интересы Николая Николаевича сместились в область изучения биологии стволовых клеток человека. Н.Н. Никольский выступил инициатором создания Программы Президиума РАН “Стволовые клетки”, а позднее принимал активное участие в реализации Программы “Молекулярная и клеточная биология”. Его интересовали как фундаментальные аспекты проблемы, так и возможности развития клеточных биотехнологий. Очередным знаковым научным событием стал проект “Молекулярно-клеточные технологии для лечения социально значимых заболеваний” (2014–2018), поддержанный Российским научным фондом по приоритетному направлению “Реализация комплексных научных программ организаций”. Под руководством Николая Николаевича и при его непосредственном участии был создан Центр клеточных технологий, призванный обеспечить как фундаментальные, так и прикладные работы Института в области клеточной биологии.

За годы научной деятельности Николай Николаевич в соавторстве не только со своими коллегами, но и сотрудниками смежных институтов и университетов опубликовал более 300 научных работ в отечественной и зарубежной печати и сформировал целую школу своих учеников. За годы существования только ЛФКЦ из нее вышло более 30 кандидатов и 4 доктора биологических наук. К сожалению, обстановка 90-х гг. прошлого века в стране и науке вынудила многих из них покинуть Россию, но полученная научная база позволила им успешно продолжать работать в ведущих зарубежных лабораториях.

Более 15 лет (с 1997 г.) Николай Николаевич руководил созданной им на базе ИНЦ РАН Кафедрой физико-химической биологии на Факультете медицинской физики и биоинженерии в Санкт-Петербургском государственном политехническом университете. Здесь он организовывал чтение лекций, отражающих современный уровень клеточной био-

логии, необходимый выпускникам Факультета, многие из которых работают сейчас в Институте.

С 1989 г. и до конца жизни Николай Николаевич был бессменным главным редактором журнала “Цитология” и отдавал много сил развитию и совершенствованию этого издания. За время его руководства журнал приобрел новый внешний облик, стал публиковать необходимые для передачи информации цветные иллюстрации к статьям, в том числе цветные микрофотографии, что привлекло к журналу новых читателей и повысило его авторитет среди авторов. С 2007 г. издается переводная англоязычная версия журнала (“Cell Tissue Biology”), в которую принимаются и статьи иностранных авторов.

Николай Николаевич был удивительным Учителем, ценившим в молодых сотрудниках увлеченность наукой и независимость, и потому позволявшим им самостоятельно выбирать тему работы. Он радовался успехам и огорчался неудачам молодых, всегда мог поддержать мудрым советом. Он готов был прислушиваться к мнению не только старших сотрудников, но и студентов, если это мнение было обосновано и разумно. Он хорошо понимал людей, и умел видеть и ценить в них самое лучшее.

Благодаря выдающимся аналитическим способностям, прекрасной научной интуиции и исключительному человеколюбию, Николай Николаевич внес огромный вклад в развитие инфраструктуры, научного и кадрового потенциала Института. Его организаторские способности и масштаб видения проблем современной биологии получили признание в 1990 г., когда Николай Николаевич был избран членом-корреспондентом АН СССР по Отделению биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений, а в 1992 г. — академиком РАН. В течение многих лет он был членом бюро Отделения биологических наук, активно участвуя в работе Президиума Санкт-Петербургского научного центра.

9 октября 2021 г. Николаю Николаевичу должно было исполниться 90 лет. Он был полон энергии и идей, и даже не думал о том, что уже прошел свой жизненный путь. Но судьба распорядилась иначе. Коллектив Отдела и Института в целом, все его ученики в десятках лабораторий мира, его друзья, скорбят в связи с невосполнимой потерей выдающегося ученого и неординарного человека, с именем которого ассоциируется Институт цитологии РАН.

*Е. С. Корнилова, И. А. Гамалей, Н. А. Михайлова,
Н.А. Виноградова, И.И. Марахова, А. Н. Томилин*